

Mark Schleyer

**Chemische und enzymatische
Untersuchungen zur Struktur
des Kollagens**

1967

**CHEMISCHE UND ENZYMATISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUR STRUKTUR DES KOLLAGENS**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu
München

vorgelegt
von
Mark Schleyer
aus
München

1960



1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. G r a s s m a n n

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. L y n e n

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Dezember 1960

1. EINLEITUNG 2

2. DANKBARKEIT 3

3. GEBET 4

4. SCHLUS 5

5. VERMERK 6

6. VERMERK 7

7. VERMERK 8

8. VERMERK 9

9. VERMERK 10

10. VERMERK 11

11. VERMERK 12

12. VERMERK 13

13. VERMERK 14

14. VERMERK 15

15. VERMERK 16

16. VERMERK 17

17. VERMERK 18

18. VERMERK 19

19. VERMERK 20

20. VERMERK 21

21. VERMERK 22

22. VERMERK 23

23. VERMERK 24

24. VERMERK 25

25. VERMERK 26

26. VERMERK 27

27. VERMERK 28

28. VERMERK 29

29. VERMERK 30

30. VERMERK 31

31. VERMERK 32

32. VERMERK 33

33. VERMERK 34

34. VERMERK 35

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit

gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München, in der Zeit von 1957 bis 1960 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. W. G r a B m a n n , Direktor des Max-Planck-Institutes für Eiweiß- und Lederforschung, möchte ich an dieser Stelle für die Anregung der vorliegenden Arbeit sowie für die mir erwiesene Unterstützung während ihrer Durchführung meinen ergebensten Dank aussprechen.

Meinen ganz besonderen Dank möchte ich ferner Herrn Dr. K. H a n n i g sagen, der mir während der Durchführung dieser Arbeit jederzeit mit seinen wertvollen Ratschlägen zur Seite stand.

Inhaltsverzeichnis

A. EINLEITUNG	6
VERSUCHE UND ERGEBNISSE DER VORLIEGENDEN ARBEIT	13
I. Aufarbeitung eines mit ungereinigtem Trypsin erhaltenen Abbaugemisches von Prokollagen	13
1. Herstellung und tryptischer Abbau von Prokollagen	13
2. Trennung und Reinigung der Abbaupeptide	15
a) Elektrophoretische Trennung des Abbaugemisches bei pH 4,9	15
b) Untersuchungen an der aus der elektrophoretischen Trennung bei pH 4,9 erhaltenen S-Fraktion	17
c) Untersuchungen an der aus der elektrophoretischen Trennung bei pH 4,9 erhaltenen N-Fraktion	23
d) Untersuchungen an der aus der elektrophoretischen Trennung bei pH 4,9 erhaltenen B-Fraktion	24
3. Diskussion der Ergebnisse	24
II. Abbau des Prokollagens mit einem Trypsin-Chymotrypsin-Gemisch	26
III. Versuche zur Reinigung von Trypsin	29
1. Versuche zur säulenchromatographischen Reinigung von Trypsin	30
2. Versuche zur elektrophoretischen Reinigung von Trypsin	32
IV. Aufarbeitung eines mit gereinigtem Trypsin erhaltenen Abbaugemisches von Prokollagen und Charakterisierung der isolierten Peptide	38
1. Abbau des Prokollagens mit gereinigtem Trypsin	38
2. Trennung und Reinigung der Peptide	38
a) Elektrophoretische Trennung des Abbaugemisches bei pH 4,9	38
b) Untersuchungen an der aus der elektrophoretischen Trennung bei pH 4,9 erhaltenen S-Fraktion	40
c) Untersuchungen an der aus der elektrophoretischen Trennung bei pH 4,9 erhaltenen N-Fraktion	43
d) Untersuchungen an der aus der elektrophoretischen Trennung bei pH 4,9 erhaltenen B-Fraktion	48
e) Zusammenfassung der aus dem beschriebenen Trennungsgang erhaltenen Ergebnisse	49
3. Bausteinanalyse der in einheitlicher Form gewonnenen Abbaupeptide	49
a) Aminosäurezusammensetzung	49
b) Endgruppenbestimmungen u. Sequenzermittlungen	51
4. Diskussion der Ergebnisse	58

C. METHODISCHE EINZELHEITEN	66
I. Darstellung und Reinigung von Abbaupeptiden des Pro-	
kollagens	66
1. Darstellung von Prokollagen	66
2. Tryptischer Abbau des Prokollagens	68
3. Elektrophoretische Trennung der Prokollagenpeptide	69
a) Trennung in der VA-Apparatur	69
b) Trennung in der VAP-Apparatur	70
4. Säulenchromatographische Trennung der Prokollagen-	
peptide	70
5. Entsalzen der säulenchromatographisch getrennten	
Peptide	72
a) Entsalzen an Dowex 1 x 2	72
b) Entsalzen an Sephadex	73
c) Entsalzen durch Ausäthern	75
6. Papierchromatographische Trennung der Prokollagen-	
peptide und nachfolgende Elution	76
7. Prüfung der Peptide auf Einheitlichkeit	78
8. Zur Berechnung der geschätzten Ausbeuten	78
II. Bausteinanalyse der in einheitlicher Form gewonnenen	
Abbaupeptide	79
1. Quantitative Aminosäureanalyse	79
2. Aminoendgruppenbestimmung	80
3. Carboxylendgruppenbestimmung	82
a) Bestimmung der C-terminalen Aminosäure mit	
Hydrazin	82
b) Bestimmung der C-terminalen Aminosäure mit	
Arginase	84
4. Enzymatischer Abbau mit Aminopolypeptidase	85
5. Enzymatischer Abbau mit Carboxypeptidase A	87
6. Enzymatischer Abbau mit Carboxypeptidase B	88
III. Trennung von Trypsin und Chymotrypsin	89
1. Säulenchromatographische Trennung von Trypsin und	
Chymotrypsin	89
2. Elektrophoretische Trennung von Trypsin und Chymo-	
trypsin	91
3. Aktivitätsbestimmung des Trypsins	91
a) Nach Riedel und Wunsch	91
b) Nach der Anson-Methode	92
4. Aktivitätsbestimmung des Chymotrypsins	92
D. ZUSAMMENFASSUNG	93
E. LITERATUR	96
F. TABELLARISCHER ANHANG (Aminosäureanalysen)	101

A. Einleitung

Als der Hauptbestandteil der Haut, der Sehnen und der verbindenden Gewebe zählt das Kollagen zu den vorherrschendsten und den am weitesten verbreiteten Proteinen des Tierreiches. Weiterhin dient das Kollagen als Baumaterial für die Grundsubstanz der Knochen und Knorpel sowie für die zahllosen inneren Membranen und Häutchen. Auch die Lymphknoten sind aus Kollagenfasern aufgebaut. Als verästeltes Flechtwerk des Bindegewebes durchziehen die Kollagenfasern ferner die Zwischenräume der Muskelfasern und der Organe.

Chemisch ist die Kollagenfaser durch ihren hohen Gehalt an Glycin, Prolin und Hydroxyprolin sowie durch die Anwesenheit von Hydroxylysin gekennzeichnet; weder Hydroxyprolin noch Hydroxylysin finden sich in anderen Eiweißkörpern, so daß besonders diese beiden Aminosäuren als Charakteristikum und daher auch zum spezifisch chemischen Nachweis von Kollagen dienen können.

Die chemischen Bausteine des Kollagens sind die Aminosäuren; sie bilden lange Peptidketten, durch deren Neben- und Hintereinanderlagerung Fäden, die sog. Kollagenfibrillen, gebildet werden. Nachdem man bisher keine freien Aminoendgruppen und keine sicher meßbaren Mengen endständiger freier Carboxylendgruppen finden konnte (1 - 4), muß angenommen werden, daß die Peptidketten sehr lang sind; möglicherweise durchziehen die Molekülketten die Kollagenfaser in ihrer gesamten Länge.

Neben den Aminosäuren enthalten die Kollagenfibrillen noch geringe Mengen Kohlenhydrate, wovon etwa 0,5 % auf Hexosen (Glucose, Galactose, Mannose und Fukose) und 0,2 - 0,5 % auf Hexosamine, besonders Glucosamin, entfallen (5 - 8). Man nimmt an, daß die Kohlenhydrate den sauren Polysacchariden des Bindegewebes entstammen.

Im Elektronenmikroskop betrachtet zeigen die Kollagenfibrillen ein hochdifferenziertes, charakteristisches Querstreifungsmuster (Abb. 1) mit einer Periode von 600 - 700 Å. GRASSMANN und TRUPKE legten bereits 1951 dieser Querstreifung ein Strukturschema zu Grunde, für

welches eine Häufung bestimmter Bausteine in einzelnen Teilen der Molekülkette charakteristisch ist, und sie sprachen die experimentell begründete Vermutung aus, daß in den im Elektronenmikroskop sichtbaren dunklen Teilen der Kollagenfibrille eine Häufung polarer Aminosäuren (Dicarbon- und Diaminosäuren) vorliegen müsse (9). Ein Jahr später postulierte BEAR diese dunklen Streifen ("bands") ebenfalls als Anhäufungen polarer Aminosäuren und bezeichnete diese Bereiche auf Grund der Sperrigkeit der Seitenketten dieser Aminosäuren als Regionen relativer Unordnung, die hellen Streifen ("interbands") dagegen als Regionen relativer Ordnung ("kristalliner Bereich", Aminosäuren mit kleineren Seitenketten wie Glycin, Prolin usw.) (10,11). - Diese Vermutungen konnten bisher mehrmals und auch durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden.

Die vorliegende Arbeit soll dem Ziel näherkommen, die Querstreifung des Kollagens eindeutig mit dem Bau der Molekülketten in Zusammenhang bringen zu können; die elektronenmikroskopische Technik ist in den letzten Arbeiten von KÜHN, HOFMANN und GRASSMANN so weit entwickelt worden, daß es möglich ist, basische Aminosäuren, insbesondere Arginin, saure Aminosäuren und mit gewissen Einschränkungen Kohlenhydrate im elektronenmikroskopischen Bild zu lokalisieren (12 - 14); so bietet sich hier die seltene Gelegenheit, eine physikalische Methode, die uns ein ganz bestimmtes Strukturprinzip aufzeigt, mit in den Dienst der Sequenzuntersuchungen einbauen zu können.

Das Monomere des Kollagens ist das Tropokollagen (15 - 16), dessen aus drei Einzelketten aufgebaute Moleküle (Protofibrillen) nach BOEDTKER und DOTY (1956) eine Länge von 2600 - 3000 Å, einen Durchmesser von 14 Å und ein Molekulargewicht von 360000 aufweisen (17). Für die geordneten Bereiche der Fibrille ist nach den ausschließlich aus Röntgenstrukturdaten abgeleiteten Vorstellungen von RICH und CRICK u. a. (18 - 23;10) ein hoher Gehalt an Glycin, Prolin und Hydroxyprolin charakteristisch.

Die normale Kollagenfibrille mit ihrer Querstreifungsperiode von etwa 640 Å entsteht nach den Vorstellungen von F. O. SCHMITT und HICHERBERGER (1955, (24)), die durch die letzten Ergebnisse von KÜHN,

GRASSMANN und HOFMANN (1959/60) sowie von F. O. SCHMITT (1959/60) gesichert werden konnten (25,26), durch eine Zusammenlagerung von Protofibrillen, die je um ein Viertel ihrer Länge gegeneinander verschoben sind (Abb. 1); das Querstreifungsmuster der normalen Kollagenfibrille entspricht also nicht direkt der Aminosäureanordnung längs der Peptidkette.

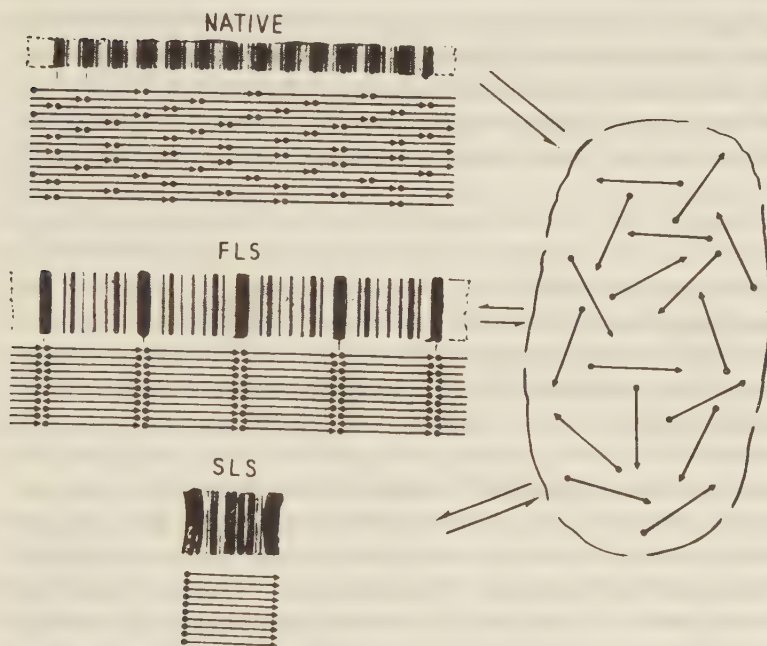


Abb. 1. Schematische Darstellung von drei möglichen Aggregationsformen des Tropokollagen-Makromoleküls, die sich unter geeigneten Bedingungen aus verdünnten sauren Lösungen von Tropokollagen reversibel bilden können (native Kollagenfibrille; long-spacing-Fibrille (FLS); long-spacing-Segment (SLS). Nach F. O. SCHMITT u. Mitarb. Erläuterung im Text.

Man kann jedoch aus Lösungen von Kollagenmonomeren mittels Adenosintriphosphat oder saurer Mucopolysaccharide Teilchen von ca. 2800 Å Länge abscheiden; diese in der Natur nicht vorkommenden Teilchen werden als "segments-long-spacing" (SLS) bzw. "fibrous-long-spacing" (FLS) (vgl. Abb. 1) bezeichnet (27). Wenn die Vorstellung von F. O. SCHMITT zutrifft, dann sollte das Querstreifungsmuster der Segmente in einem unmittelbaren Zusammenhang mit der Aminosäuresequenz stehen.

Auf Grund der erwähnten Untersuchungen und Ergebnisse können wir annehmen, daß das Tropokollagenmolekül aus drei Ketten mit je etwa 1000 Aminosäuren besteht; nach neueren Untersuchungen von DOTY und NISHIHARA (1958) können die Ketten in ihrer Länge etwas variieren (28); ob sie auch sonst chemisch verschieden sind, ist bisher offen.

Um kleinere, für eine Sequenzuntersuchung geeignete Bruchstücke zu erhalten, spalten GRASSMANN und Mitarbeiter das Kollagenmaterial mit kristallisiertem Trypsin (29). Als Ausgangsmaterial wurde das sog. Prokollagen verwendet, das aus citratlöslichem Kollagen durch Dialyse gegen schwach alkalisches Wasser (pH = 7,5) in Form mikroskopisch feiner Fäserchen mit der Querstreifungsperiode von etwa 650 Å gewonnen werden kann (30). Prokollagen (säurelösliches Kollagen) unterscheidet sich vom Kollagen lediglich durch sein Löslichkeitsverhalten gegenüber Wasserstoffbrücken sprengenden Agentien, woraus man schließen muß, daß das fertige Kollagen durch zusätzliche Quervernetzungen eine stabilere Form darstellt als das säurelösliche Kollagen; kein Unterschied besteht jedoch in der Aminosäurezusammensetzung (Tab. 1, S. 15) und im Querstreifungsmuster. Auf Grund seiner guten Löslichkeit kann das Prokollagen durch mehrmaliges Lösen und Wiederabscheiden in Faserform ("Umkristallisieren") besonders rein gewonnen werden.

Aus einem Abbau von Prokollagen mit kristallisiertem Trypsin konnten GRASSMANN und Mitarbeiter 1956 eine Anzahl Peptide gewinnen (29), von denen eines, die sog. S_F-Fraktion, besonders leicht zu reinigen war und näher untersucht wurde. An diesem Peptid konnte durch enzymatische Abbauversuche vom Amino- und Carboxylende her die Aminosäuresequenz teilweise aufgeklärt werden; das Carboxylende bestand

aus schweren und polaren Aminosäuren, war jedoch frei von Prolin und Hydroxyprolin; auch die ersten sechs Aminosäuren am Aminoende enthielten keine der beiden Iminosäuren, während das aus 33 Aminosäuren bestehende nicht aufgeklärte Mittelstück fast nur aus Glycin, Prolin und Hydroxyprolin aufgebaut war (vgl. S. 23). Etwas unerwartet war an diesem Peptid, daß am Carboxylende Asparaginsäure C-terminal auftrat, während nach einer Spaltung mit Trypsin nur eine basische Aminosäure carboxylendständig zu erwarten gewesen wäre; das verwendete Trypsinpräparat hat in diesem Falle Spuren von Chymotrypsin enthalten. - Diese bei der Untersuchung der Fraktion S_f erhaltenen Befunde dürften als eine erste chemische Bestätigung der Vorstellungen von GRASSMANN und TRUPKE sowie von BEAR gelten, wonach vermutet wird, daß die Querstreifung der Kollagenfibrille auf die abwechselnden Anhäufungen schwerer und polarer und Anhäufungen leichterer, apolarer Aminosäuren zurückzuführen ist (9 - 11).

Meine Aufgabe war es nun, eine vollständige Aufarbeitung des mit völlig einheitlichem Trypsin erhaltenen Abbaugemisches von Präkollagen durchzuführen und an Hand der dabei isolierten Peptide zu prüfen, wie weit das von GRASSMANN und TRUPKE sowie von BEAR postulierte Bauprinzip für die gesamte Kollagenfibrille Gültigkeit besitzt.

Für meine Untersuchungen verwendete ich ebenfalls säurelösliches Kollagen, das ich jedoch mit vorher durch Elektrophorese und durch Behandlung mit Salzsäure gereinigtem Trypsin (31) abbaute. Obwohl der Abbau zu einem scharfen Endpunkt - entsprechend einer mittleren Kettenlänge der Abbauprodukte von 18 Aminosäuren - führte, wurden nur etwa 60 % derjenigen Peptidbindungen, an denen die Carboxylgruppen von Lysin und Arginin beteiligt sind, geöffnet (vgl. S. 39 u. Abb. 10). Unter Voraussetzung eines Molekulargewichtes von 360000 waren ca. 160 Peptide zu erwarten. Die Auftrennung eines so komplizierten Gemisches langkettiger Peptide ist schwierig und bisher noch an keinem anderen Beispiel durchgeführt worden. Sie gelang jedoch schließlich durch die Kombination mehrerer Trennmethode, nämlich der kontinuierlichen Papierelektrophorese in ihrer heute leistungsfähigsten Ausführungsform (Kühlung, hohe Spannung und Stromstärke usw.)

(32), Säulenchromatographie am Ionenaustauscher Dowex 1 x 2 und schließlich präparative Papierchromatographie. Auf diese Weise konnten 114 Peptide gewonnen werden, wovon 54 Peptide papierelektrophoretisch und -chromatographisch, vor allem aber auf Grund der sich aus den Aminosäureanalysen ergebenden sauberen stöchiometrischen Verhältnisse als rein zu bezeichnen waren; diese 54 Peptide repräsentieren in ihrer Gesamtheit etwa 54 % des Gesamtabbaugemisches.

Es wurden von allen reinen Peptiden Aminosäureanalysen und - soweit die vorhandenen Mengen es zuließen - Endgruppenbestimmungen sowie enzymatische Abbaubersuche zur Festlegung der C- und N-terminalen Sequenzen durchgeführt.

Die Ergebnisse lassen erkennen, daß nur basische Aminosäuren - wie es auf Grund der Spezifität des Trypsins zu erwarten war - carboxylendständig waren, während als aminoendständige Aminosäure in jedem Falle Glycin gefunden wurde, d. h., es sind durch Trypsin nur Bindungen zwischen basischen Aminosäuren und Glycin gespalten worden.

Der Gehalt an Prolin + Hydroxyprolin der analysierten Peptide ist im großen und ganzen gegenläufig zum Gehalt an polaren Aminosäuren (Dicarbonsäuren + Diaminosäuren) (vgl. Tab. 11, S. 52), was für das Vorliegen von stark polaren und apolaren Bereichen in den Peptidketten des Kollagenmoleküls spricht und die Annahme GRASSMANNs und TRUPKEs sowie BEARs bestätigt.

Auch geht aus den Analysenwerten hervor, daß in allen isolierten Fraktionen recht genau ein Drittel aller Aminosäuren eines Peptids auf Glycin entfallen. Da Glycin auch in der Analyse des Gesamtkollagens ein Drittel aller Aminosäuren ausmacht, spricht der erwähnte Befund dafür, daß Glycin in einer gewissen Regelmäßigkeit über das ganze Kollagen verteilt ist.

Ferner zeigen meine Ergebnisse, daß in den meisten Peptiden, an denen quantitative Endgruppenbestimmungen durchgeführt werden konnten, die Menge der Endgruppen dreimal so groß gefunden wird als nach dem aus der Analyse errechneten Mindestmolekulargewicht zu erwarten gewesen wäre; es muß daher angenommen werden, daß in einem großen Teil der Abbaupeptide drei Ketten im einfachen stöchiometrischen Verhältnis zusammenhängen, die mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht

aufgetrennt werden konnten. Ob dabei mehr oder weniger zwischenmolekulare Kräfte für eine Bindung der Ketten verantwortlich sind, kann bei dem derzeitigen Stand der Untersuchungen noch nicht eindeutig geklärt werden.

Im folgenden wird zunächst ein Versuch mit einem handelsüblichen kristallinen Trypsin beschrieben (Abschnitt I). Dabei stellte sich übereinstimmend mit den Ergebnissen von GRASSMANN und Mitarbeitern aus dem Jahre 1956 (29) heraus, daß außer basischen Aminosäuren auch Asparaginsäure, Valin und Alanin carboxylendständig auftraten (33).

Ein von vornherein mit Trypsin + Chymotrypsin (zu gleichen Anteilen) durchgeführter Abbauversuch (Abschnitt II, S. 26) machte in der Aufarbeitung derartige Schwierigkeiten, daß er vorzeitig abgebrochen wurde.

Daraufhin habe ich ein elektrophoretisches Verfahren zur präparativen Herstellung von völlig einheitlichem Trypsin aus kristallisiertem Handelstrypsin entwickelt (Abschnitt III, S. 29).

Nach diesen vorbereitenden Versuchen wurde schließlich mit einheitlichem Trypsin ein Hauptversuch mit der Aufarbeitung von 60 g säurelöslichem Kollagen durchgeführt, dessen im Vorausgegangenen bereits ganz kurz skizzierte Ergebnisse in Abschnitt IV beschrieben und in der Gesamtdiskussion (S. 58) ausgewertet werden.

B. Versuche und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

I. Aufarbeitung eines mit ungereinigtem kristallinem Trypsin erhaltenen Abbaugemisches von Prokollagen

1. Herstellung und tryptischer Abbau von Prokollagen

Das aus Häuten von wenige Tage alten Kälbern nach einer etwas abgewandelten Vorschrift von OREKHOVITSCH (34) hergestellte und zweimal "umkristallisierte" Prokollagen (S. 66) mit einem Gesamtstickstoffgehalt (nach Kjehldahl) von 17,13 %, einem Hexosengehalt von 0,6 % und einem Aschegehalt von 0,25 % (Aminosäureanalyse vgl. Tab. 1, S. 15) wurde zunächst denaturiert und anschließend mit nicht vorbehandeltem kristallinem Trypsin⁺ bei 37° C verdaut. Den tryptischen Abbau des Prokollagens verfolgte ich titrimetrisch nach der Methode von Waldschmidt-Leitz (S. 68); das Ergebnis dieser Titration ist in Abb. 2 graphisch dargestellt; aus der Kurve ist zu ersehen, daß bereits nach vierstündiger Inkubation der Abbau beendet zu sein scheint.

Entnimmt man jedoch der Abbaulösung zu verschiedenen Zeiten Proben und untersucht sie in der kontinuierlichen Elektrophorese-Anordnung nach GRASSMANN-HANNIG (37) (Versuchsbedingungen vgl. Absatz 2. a und S. 69), so kann festgestellt werden, daß nach einer vierstündigen Abbaupzeit noch keine genügende elektrophoretische Auftrennung der tryptischen Spaltprodukte erzielt wird; erst bei Abbaupzeiten von ca. 16 Stunden kann ein gutes Trennbild der entstandenen Fraktionen erreicht werden, das sich durch längere Abbaupzeiten nicht mehr verbessern läßt. Dieser Befund konnte an mehreren, zu verschiedenen Zeiten durchgeführten Prokollagenaufarbeitungen bestätigt werden. - Auf Grund dieser Ergebnisse wurden alle Abbaupversuche an Prokollagen über etwa 16 Stunden durchgeführt (S. 68).

⁺ Für alle in dieser Arbeit durchgeführten tryptischen Abbaupversuche wurde das Trypsinpräparat "Trypure-Novo" (krist. reines Trypsin; stabilisiert; Aktivität: 0,171 Anson-Einheiten/mg Protein-N) der Firma Novo-Industrie, Kopenhagen-N, verwendet.

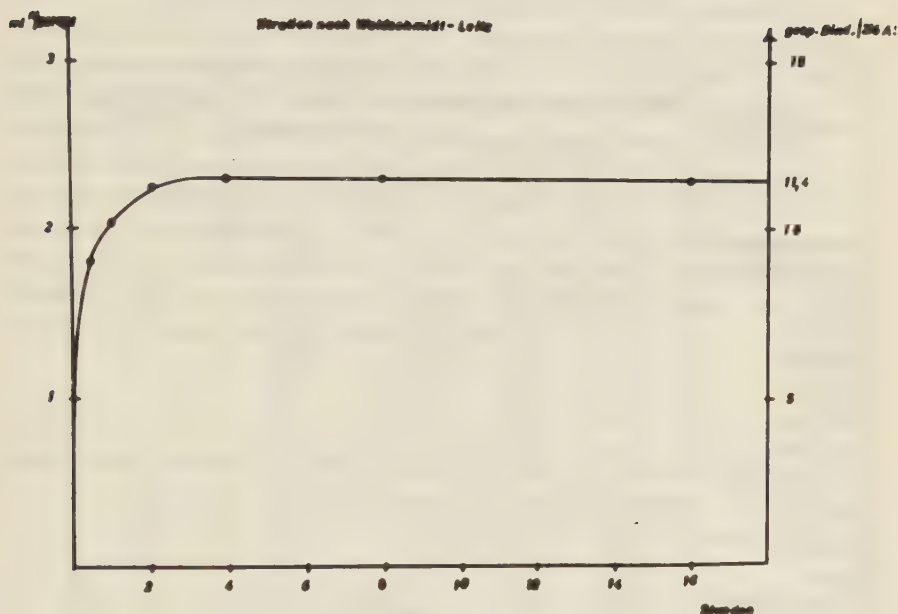


Abb. 2. Abbau des Prokollagens mit ungereinigtem kristallinem Trypsin. Titration der freigesetzten Carboxylgruppen nach Waldschmidt-Leitz.

Aus der Titrationskurve (Abb. 2) kann entnommen werden, daß trotz des scharfen Endpunktes des Abbaus nur etwa 60 % derjenigen Peptidbindungen, an denen die Carboxylgruppen von Lysin und Arginin beteiligt sind, geöffnet werden; danach sind unter Voraussetzung eines Molekulargewichtes von 360000 für Kollagen (17) etwa 160 Abbaupeptide mit einer mittleren Kettenlänge von 18 Aminosäuren zu erwarten. Um dieses so komplizierte Gemisch von Peptiden mit relativ hohen Molekulargewichten zu trennen, bediente ich mich der präparativen kontinuierlichen Elektrophoreseanordnung (37).

Tabelle 1

Aminosäureanalysen von Kollagen und Prokollagen

Aminosäuren	Mol/100 Mol Aminosäure			Verhältnisse der Aminosäuren	Abgerundete Werte
	I	II	III	IV	V
Asparaginsäure	4,73	4,76	4,5	10,2	10
Glutaminsäure	7,55	7,58	7,4	16,3	16
Glycin	32,86	32,73	35,1	70,8	71
Alanin	10,87	10,78	12,0	23,2	23
Serin	3,12	2,92	3,9	6,3	6
Threonin	1,77	1,88	1,7	4,1	4
Tyrosin	0,42	0,39	0,3	0,8	1
Valin	2,24	2,26	2,2	4,9	5
Methionin	0,66	0,45	0,6	1,0	1
Isoleucin	1,24	1,22	1,0	2,7	3
Leucin	2,38	2,66	2,4	5,8	6
Phenylalanin	1,29	1,47	1,3	3,2	3
Prolin	13,39	13,18	10,1	28,8	29
Hydroxyprolin	8,28	8,23	9,6	17,8	18
Histidin	0,60	0,65	0,3	1,3	1
Lysin	2,70	2,88	2,5	6,2	6
Hydroxylysin	0,55	0,51	0,5	1,1	1
Arginin	5,35	5,45	4,6	11,8	12
Summe	100,00	100,00	100,0	216,3	216

- I: Aminosäureanalyse des Kollagens (Apparatur nach HANNIG (35))
 II: Aminosäureanalyse des Prokollagens (Apparatur nach HANNIG (35))
 III: Aminosäureanalyse des Prokollagens nach I. H. BOWES (36)
 IV: Kleinstes stöchiometrisches Verhältnis der Aminosäuren, berechnet aus der Analyse in Spalte II
 V: Abgerundete Werte der Verhältniszahlen aus Spalte IV

2. Trennung und Reinigung der Abbaupeptide

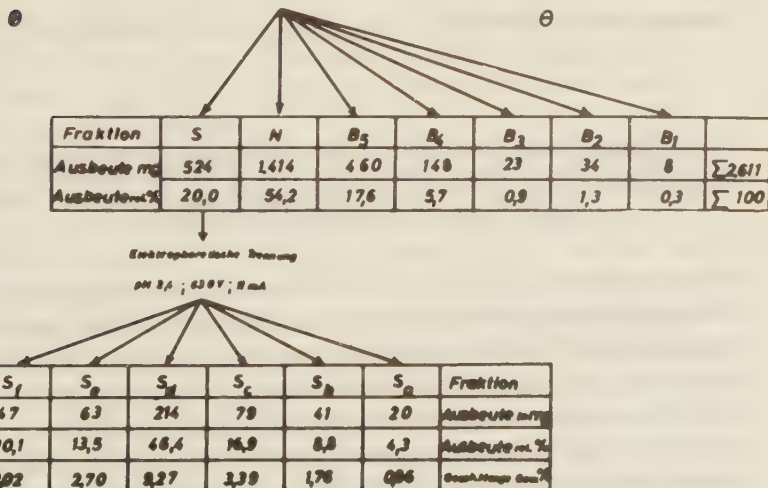
a) Elektrophoretische Trennung des Abbaugemisches bei pH 4,9

Das aus dem tryptischen Abbau von 4 g Prokollagen erhaltene Peptidgemisch wurde in der kontinuierlichen Elektrophoreseanordnung nach GRASSMANN-HANNIG (37) in einem Pyridin-Eisessig-Wasser-Puffer vom

pH 4,9 bei 600 V und 20 mA präparativ in sieben Fraktionen getrennt, die ich je nach ihrem Verhalten im elektrischen Feld bei diesem pH-Wert als saure (S), neutrale (N) und basische (B) Fraktionen bezeichnete. Um die Lage der Fraktionen festlegen zu können, wurde aus jedem Auffanggläschen 1 ml Lösung entnommen, mit 0,5 ml Ninhydrinreagenz versetzt und 20 min auf 100° C erhitzt. Auf Grund der im Colorimeter bei 520 m μ gemessenen Extinktionen vereinigte ich die entsprechenden Gläschen zu den Fraktionen S, N und B₁ bis B₅, deren Ausbeuten nach der anschließenden Gefriertrocknung in Tabelle 2 wiedergegeben sind. - Die einzelnen Fraktionen wurden unter den gleichen Bedingungen bei pH 4,9 noch mehrmals elektrophoretisch gereinigt, bis sie bei diesem pH-Wert einheitlich erschienen.

Tabelle 2

Schematische Darstellung der papierelektrophoretischen Auftrennung eines tryptischen Abbaugemisches von Prokollagen



b) Untersuchungen an der aus der elektrophoretischen Trennung bei pH 4,9 erhaltenen S-Fraktion

Die aus der elektrophoretischen Trennung bei pH 4,9 bei diesem pH-Wert einheitlich gewonnene Fraktion S trennte ich elektrophoretisch bei pH 2,4 (0,5 n Essigsäure), 630 V, 11 mA weiter auf. Die Verteilung der ninhydrinpositiven Komponenten geht aus Abb. 3 hervor, ihre Ausbeuten sind aus Tabelle 2 ersichtlich. Die mit S_a bis S_f bezeichneten

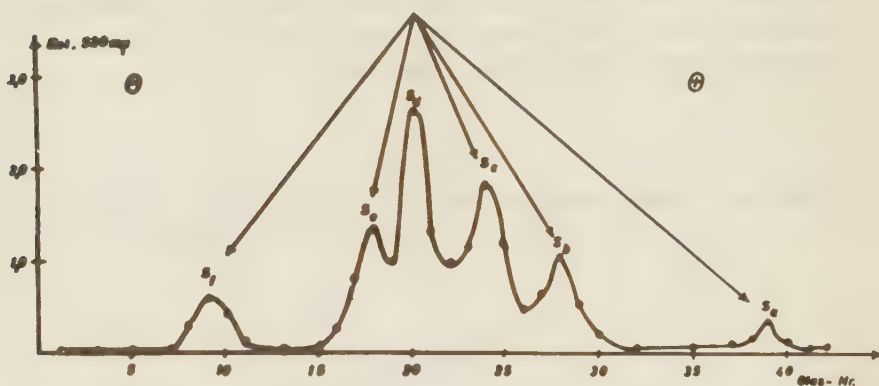


Abb. 3. Tryptisches Abbaugemisch von Prokollagen. Verteilung der mit Ninhydrin angefärbten Fraktionen nach der elektrophoretischen Trennung von Fraktion S in 0,5 n Essigsäure; pH = 2,4, 630 V, 11 mA, Papier Schleicher & Schüll 604L/90g.

neten Fraktionen trennte ich noch mehrmals bis zu ihrer elektrophoretischen Einheitlichkeit bei pH 2,4. Eine anschließende papierchromatographische Reinheitsprüfung in Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (4 : 4 : 1 : 5) ergab für die Fraktionen S_a , S_b , S_c , S_d und S_f Einheitlichkeit, während S_e noch aus zwei bis drei Komponenten bestand. Die Fraktionen S_a , S_b , S_c , S_d und S_f wurden analytisch, chemisch und enzymatisch, soweit es die verbliebenen geringen Ausbeuten erlaubten, weiter untersucht.

Fraktion S_a

Die nach der Methode von GRASSMANN, HANNIG und PLÖCKL (38) mittels Kombination von Papierelektrophorese und -chromatographie durchgeführte Aminosäureanalyse ergab das in Tabelle 3 angeführte Ergebnis; dieses Peptid enthält weder Prolin noch Hydroxyprolin, jedoch

Tabelle 3

Aminosäurezusammensetzung der Fraktion S_a
(Methode: Elektrophorese/Chromatographie)^a

Aminosäure	Mol %	Ver- hältn.	Abger. Werte	frühere Werte (29)
Gly	38,1	4,95	5	5
Thr	7,5	0,97	1	1
Asp	15,7	2,04	2	2
Glu	23,2	3,03	3	3
Hyls	7,7	1,00	1	1
Arg	7,7	1,00	1	1
Summe	99,9	12,99	13	13

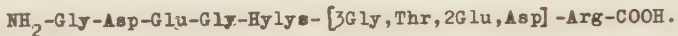
54 % polare Aminosäuren, wovon 39 % auf Dicarbonsäuren entfallen. Die Fraktion S_a stellt also ein ausgesprochen polares, und zwar stark saures Peptid dar.

Als N-terminale Aminosäure stellte ich nach der Sangerschen DNP-Methode (S. 80) Glycin fest; eine qualitative Endgruppenbestimmung am Carboxylende mittels Arginase wurde nach der Methode von M. G. ENGEL und F. ENGEL (39 - 41) durchgeführt (S. 84) und ergab Arginin als C-terminale Aminosäure⁺.

Ein quantitativ durchgeführter enzymatischer Abbau der Fraktion S_a (S. 85) mit einer von E. WEBER an unserem Institut hergestellten Aminopolypeptidase (42) zeigte, daß nach dem aminoendständigen Glycin die Aminosäuren Asparaginsäure, Glycin, Glutaminsäure und Hydroxylysin folgen. Eine Inkubation mit Carboxypeptidase A führte zu keinem Abbau der Fraktion S_a, da C-terminales Arginin von diesem Enzym nicht abgebaut wird.

⁺ Diese Bestimmung wurde freundlicherweise von Herrn Dr. O. JABOWSKI mit seiner an unserem Institut selbst hergestellten und gereinigten Arginase (40) durchgeführt.

Durch die Kombination der erwähnten Versuchsergebnisse kann für das Peptid S_a folgendes Formelbild⁺ aufgestellt werden:



Fraktion S_b

Das Ergebnis der Aminosäureanalyse ist in Tabelle 4 zusammengefaßt.
- Als N-terminale Aminosäure wurde für die S_b-Fraktion nach der DNP-Methode Glycin ermittelt. Eine C-terminale Aminosäure konnte mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht festgestellt werden;

Tabelle 4

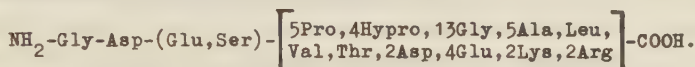
Aminosäurezusammensetzung der Fraktion S_b
(Methode: Elektrophorese/Chromatographie)

Aminosäure	Mol %	Ver- hältn.	Abger. Werte	Frühere Werte (29)
Gly	32,0	14,1	14	14
Ala	11,0	4,9	5	5
Val	1,0	0,5	1	1
Leu	2,1	0,9	1	1
Ser	2,6	1,1	1	1
Thr	1,6	0,7	1	1
Pro	11,7	5,1	5	5
Hyp	9,0	4,0	4	4
Asp	7,1	3,1	3	3
Glu	10,8	4,8	5	5
Lys	4,7	2,1	2	2
Arg	4,7	2,1	2	2
Summe	98,3	43,4	44	44

ein Abbau mit Arginase fand nicht statt, so daß Arginin als carboxyl-
endständige Aminosäure wahrscheinlich nicht in Frage kommt; mit
Carboxypeptidase A fand ebenfalls kein Abbau statt; auch die Endgrup-
penbestimmung nach Akabori (S. 82) führte zu keinem überzeugenden Er-
gebnis. - Der enzymatische Abbau mit Aminopolypeptidase ergab nach
12 Stunden ein schwaches Auftreten von Glycin. Im weiteren Verlauf des
Abbaus trat noch sehr schwach Asparaginsäure, später Glutaminsäure
und Serin auf. Auf Grund der Reihenfolge der auftretenden schwachen

⁺ Die bei Formelbildern in den eckigen Klammern stehenden Aminosäuren gehören dem unaufgeklärten Mittelstück des Peptids an, während in den runden Klammern diejenigen Aminosäuren aufgeführt sind, die zwar durch enzymatische Abbaumethoden bestimmt, jedoch nicht in ihrer Sequenz festgelegt werden konnten.

nicht auswertbaren Aminosäureflecken glaube ich, die Fraktion S₀ folgendermaßen postulieren zu können:



Dieses Peptid hat auf Grund der Aminosäureanalyse polaren Charakter: Einem Gehalt von 20 % Iminosäuren stehen 27 % polare Aminosäuren (18 % Dicarbonsäuren, 9 % Diaminosäuren) gegenüber. Aus der Sequenzformel ist ersichtlich, daß sich unter den ersten Aminosäuren vom Aminoende her keine Iminosäuren befinden; dieser Bereich hat stark sauren Charakter.

Fraktion S_c

Die Aminosäureanalyse der S_c-Fraktion wurde einerseits nach der Methode von GRASSMANN, HANNIG und PLÖCKL (Kombination von Papier-elektrophorese und -chromatographie) durchgeführt (38); andererseits

Tabelle 5
Aminosäurezusammensetzung der Fraktion S_c

Aminosäure	I			II		
	Mol %	Ver- hältn.	Abger. Werte	Mol %	Ver- hältn.	Abger. Werte
Gly	36,95	9,4	9	33,60	9,0	9
Ala	10,26	2,6	3	9,35	2,5	3
Leu	3,36	0,9	1	3,34	0,9	1
Ser	2,53	0,7	1	2,54	0,7	1
Pro	11,90	3,0	3	12,50	3,3	3
Hypro	8,80	2,3	2	8,88	2,3	2
Asp	7,45	1,9	2	7,56	2,0	2
Glu	11,00	2,8	3	11,18	3,0	3
Lys	2,84	0,8	1	3,63	1,0	1
Arg	4,40	1,1	1	4,47	1,2	1
Summe	99,49	25,5	26	97,05	25,9	26

I: Aminosäureanalyse mittels Kombination von Papierelektrophorese und -chromatographie (38)

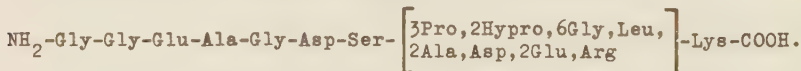
II: Aminosäureanalyse mittels Ionenaustauscherchromatographie (35)

kam bei dieser Fraktion erstmalig die von K. HANNIG (35) entwickelte Apparatur zur quantitativen Aminosäurebestimmung an Ionenaustauschersäulen mit anschließender automatischer Registrierung der Ergebnisse zur Anwendung. Die Ergebnisse beider Bestimmungen sind in Tabelle 5 zusammengestellt; beim Vergleich der nach den beiden sehr unterschiedlichen Methoden erhaltenen Analysenwerte stellt man eine sehr gute Übereinstimmung fest.

Auch die Fraktion S_c gehört zu den noch verhältnismäßig stark polaren Peptiden: 21 % Iminosäuren, 27 % polare Aminosäuren (19 % Dicarbonsäuren, 8 % Diaminosäuren).

Nach der DNP-Methode wurde Glycin als N-terminale Aminosäure gefunden. Die Carboxylendgruppenbestimmung mittels Arginase verlief negativ, ebenso die mit Carboxypeptidase A durchgeführte; die Endgruppenbestimmung nach der Methode von Akabori ergab einen schwachen Nachweis von Lysin.

Das Ergebnis eines quantitativen Abbaus der Fraktion S_c mit Aminopolypeptidase ergab folgende Sequenz der Aminosäuren:



Auch hier ist das Aminoende als ausgesprochen saurer Bereich anzusehen.

Fraktion S_d

Die Aminosäurezusammensetzung dieser Fraktion geht aus Tabelle 6 hervor. Das Verhältnis von Iminosäuren zu polaren Aminosäuren beträgt etwa 1 : 1, das von Dicarbonsäuren zu Diaminosäuren etwa 3 : 1.

Als Aminoendgruppe konnte mittels der DNP-Methode Glycin ermittelt werden. Eine Bestimmung der C-terminalen Aminosäure mittels Carboxypeptidase A verlief negativ, während nach der Methode von Akabori Ornithin gefunden wurde, das sich bei diesem Nachweis im Verlaufe der Reaktionen aus Arginin bildet. Auch eine qualitative Endgruppenbestimmung mit Arginase ergab C-terminales Arginin.

Beim enzymatischen Abbau mit Aminopolypeptidase traten außer Glycin noch Serin und Glutaminsäure auf, so daß man zusammenfassend für die Fraktion S_d folgendes Formelbild gewinnt:

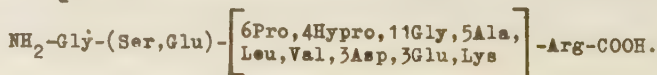


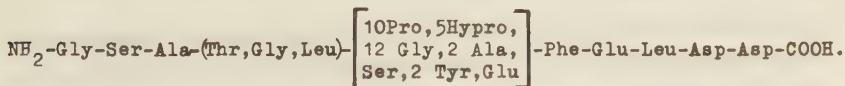
Tabelle 6

Aminosäurezusammensetzung der Fraktion S_d
(Methode: Elektrophorese/Chromatographie)

Aminosäure	Mol %	Ver- hältn.	Abger. Werte	Frühere Werte (29)
Gly	29,30	11,6	12	12
Ala	12,40	4,9	5	5
Val	2,20	0,9	1	1
Leu	2,95	1,2	1	1
Ser	2,28	0,9	1	1
Pro	14,65	5,8	6	6
Hypro	9,80	3,9	4	4
Asp	7,65	3,0	3	3
Glu	9,90	3,9	4	4
Lys	2,73	1,1	1	1
Arg	3,56	1,4	1	1-2
Summe	97,42	38,6	39	39-40

Fraktion S_f

Über diese Fraktion ist bereits von GRASSMANN und Mitarbeitern in einer ausführlichen Veröffentlichung (29) berichtet worden. Die dort beschriebene Fraktion stammte aus einem früher durchgeführten tryptischen Abbau des Prokollagens. Die im Rahmen dieser Arbeit aus einem neuen tryptischen Abbau hergestellte Fraktion S_f zeigte auf Grund der Aminosäureanalyse dieselbe Zusammensetzung (Tab. 7). Zur Analyse dieser Fraktion wurde hier die von K. HANNIG (1958) entwickelte automatische Aminosäurebestimmungsapparatur verwendet (35). - Auch die Ergebnisse der Endgruppenbestimmungen sowie die der enzymatischen Abbauprobe mit Aminopolypeptidase und Carboxypeptidase konnten bestätigt werden; für das Aminoende konnte ich die in Position 2 und 3 stehenden Aminosäuren festlegen:



Aus der Sequenzformel ist ersichtlich, daß auch bei diesem Peptid Prolin und Hydroxyprolin im unaufgeklärten Mittelstück angereichert sind, während weder unter den ersten 6 Aminosäuren vom Aminoende her noch unter den ersten 5 Aminosäuren vom Carboxylende her eine Imino-

säure angetroffen wird; die N-terminale Sequenz hat ausgesprochen apolaren, die C-terminale Sequenz stark sauren Charakter.

Tabelle 7

Aminosäurezusammensetzung der Fraktion Sf
(Methode: Säulenchromatographie)

Aminosäure	Mol %	Ver- hältn.	Abger. Werte	Frühere Werte (29)
Gly	33,2	14,0	14	14
Ala	6,9	2,9	3	3
Leu	1,9	0,8	1	1
Phe	2,6	1,1	1	1
Ser	5,7	2,4	2	2-3
Thr	1,9	0,8	1	1
Tyr	4,3	1,8	2	2
Pro	24,2	10,2	10	10
Hypro	11,3	4,8	5	5
Asp	5,0	2,1	2	2
Glu	4,7	2,0	2	2
Summe	101,7	42,9	43	43-44

c) Untersuchungen an der aus der elektrophoretischen Trennung bei pH 4,9 erhaltenen N-Fraktion

Die bei pH 4,9 nicht abgelenkte Fraktion N konnte bei pH 2,4, 740 V, 12 mA in fünf weitere Fraktionen aufgetrennt werden, die sich elektrophoretisch nur sehr schwer reinigen ließen und papierchromatographisch noch aus mehreren weiteren Komponenten bestanden. Wegen der Komplexheit des neutralen Peptidgemisches wurde von einer weiteren Aufarbeitung der Fraktionen in diesem Abbau abgesehen; eine weitere Auftrennung und teilweise Reinigung der N-Fraktionen wurde erst durch die Einführung neuer Trennverfahren möglich (vgl. Abschnitt IV).

Eine Carboxylendgruppenbestimmung nach Akabori an der Gesamt-N-Fraktion ergab als C-terminale Aminosäuren außer Lysin und Arginin noch Valin und Alanin.

d) Untersuchungen an den aus der elektrophoretischen Trennung bei pH 4,9 erhaltenen B-Fractionen

Die Fractionen B₁ bis B₅ konnten bei pH 4,9 elektrophoretisch einheitlich erhalten werden. Auf eine weitere Trennung der papierchromatographisch noch sehr uneinheitlichen Fractionen B₂ bis B₅ (B₁ war einheitlich) bei pH 2,4 verzichtete ich, da die elektrophoretische Beweglichkeit der in diesen Fractionen enthaltenen Komponenten bei diesem pH-Wert zu geringe Unterschiede aufwies.

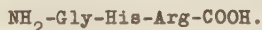
Die mittels Kombination von Papierelektrophorese und -chromatographie (38) durchgeführte quantitative Analyse der Fraction B₁ (Tab. 8) ergab für dieses Peptid je ein Mol Glycin, Histidin und Arginin und zeigt, daß es sich hier um ein ausgesprochen polares, und zwar stark basisches Peptid handelt. N-terminal fand ich nach Sanger

Tabelle 8

Aminosäurezusammensetzung der Fraction B₁
(Methode: Elektrophorese/Chromatographie)

Aminosäure	Mol %	Verhältn.	Abger. Werte	Frühere Werte (29)
Gly	34,5	1,0	1	1
His	31,0	0,9	1	1
Arg	34,5	1,0	1	1
Summe	100,0	2,9	3	3

Glycin, C-terminal nach Akabori Arginin, so daß die Sequenz dieses Tripeptids lauten muß:



3. Diskussion der Ergebnisse

Auf Grund der in Abb. 2 gezeigten Titrationskurve werden bei dem tryptischen Abbau des Prokollagens nur 60 % der im Hinblick auf den Gehalt an basischen Aminosäuren zu erwartenden Bindungen gelöst; über die eventuellen Ursachen dieser nicht 100%igen Spaltung möchte

ich erst an späterer Stelle, wenn etwas mehr Versuchsmaterial vorliegt, diskutieren (S. 61).

Der in diesem Abschnitt (I) beschriebene tryptische Abbau von Prokollagen hat gezeigt, daß eine endgültige Trennung und Reinigung der gewonnenen Abbaupeptide nicht, wie man in unserem Arbeitskreis ursprünglich zu vermuten geneigt war (29), durch die elektrophoretische Methode allein zu bewältigen ist. Nur wenige Fraktionen - eine basische und fünf saure - konnten nach mehrmaligem elektrophoretischem Trennen bei pH 4,9 und pH 2,4 papierchromatographisch als einheitlich bezeichnet werden und wurden analytisch, chemisch und enzymatisch, soweit es die geringen Ausbeuten zuließen, näher untersucht; die erhaltenen Ergebnisse lassen jedoch auf Grund des geringen vorliegenden Materials keine sehr weitgehenden Schlüsse zu.

Aus den Endgruppenbestimmungen an den Peptiden des Abbaugemisches geht hervor, daß C-terminal nicht nur Lysin und Arginin, sondern auch Asparaginsäure (S. 22), ferner Valin und Alanin (S. 23) auftreten. Dies läßt sich nur damit erklären, daß das verwendete Trypsin nicht einheitlich, sondern mit mindestens einem anderen Enzym verunreinigt war (vgl. Abschnitt III, S. 29).

N-terminal wurde an den in diesem Abschnitt beschriebenen Peptiden nur Glycin gefunden.

Die hier isolierten Peptide S_a , S_b , S_c , S_d , S_f und B_1 (33) sind auf Grund ihrer analytischen Daten den entsprechenden von GRASSMANN und Mitarbeitern 1956 veröffentlichten Peptiden (29) gleichzusetzen. Darüber hinaus können durch meine Ergebnisse die Fraktionen S_a , S_b , S_c , S_d und B_1 etwas näher charakterisiert werden, während die bereits früher erhaltenen Resultate über die Fraktion S_f von mir bestätigt werden konnten.

Im Gegensatz zu der S_f -Fraktion (29), die durch ihren hohen Gehalt an Iminosäuren (35,5 %) und niedrigen Gehalt an polaren Aminosäuren (9,7 %) ausgesprochen apolaren Charakter hat und somit in den Bereich der "interbands" (10) eingeordnet werden könnte (S. 7), gehören die Fraktionen B_1 und S_a mit ihrem hohen Gehalt (66,6 % bzw. 54,3 %) an bifunktionellen Aminosäuren zu den ausgesprochen polaren Peptiden; dagegen weisen diese beiden Fraktionen weder Prolin noch Hydroxy-

prolin auf; S_a und B_1 könnten also den von BEAR (1952) als "bands" definierten Bereichen (10) in der Kollagenfibrille zugeordnet werden. - Die Fraktionen S_b , S_c und S_d nehmen zwischen diesen beiden extrem polaren Peptiden einerseits und der extrem apolaren Fraktion S_f andererseits eine gewisse Mittelstellung ein, zeigen jedoch innerhalb der Peptidketten Bereiche, in denen saure oder apolare Aminosäuren überwiegen.

Der Gehalt an Glycin beträgt bei den hier erwähnten Fraktionen jeweils etwa ein Drittel, bezogen auf die Gesamtzahl der Aminosäuren.

II. Abbau des Prokollagens mit einem Trypsin-Chymotrypsin-Gemisch

Da ich an Hand der Ergebnisse des vorangegangenen Abschnittes eine Verunreinigung des Trypsins mit Chymotrypsin vermutete, führte ich als nächstes einen Abbau des Prokollagens mit einem Trypsin-Chymotrypsin-Gemisch durch, um nicht nur eine teilweise, sondern eine vollkommene chymotryptische Durchspaltung zu erhalten. Auch war bei einem Abbau mit Trypsin + Chymotrypsin zu erwarten, daß die Kettenlängen der entstehenden Peptide kürzer sein würden, was eine wesentliche Erleichterung für die Sequenzuntersuchungen zur Folge hätte.

Vorversuche, die durch Titration nach Waldschmidt-Leitz (S. 68) verfolgt wurden, zeigten, daß es beim Abbau von Prokollagen mit Trypsin und Chymotrypsin gleichgültig ist, ob die beiden Fermente gleichzeitig der Prokollagensuspension zugesetzt werden oder ob die Zugabe des Chymotrypsins erst 20 Stunden nach der des Trypsins bzw. umgekehrt erfolgt; in jedem Falle führt der Abbau zu dem gleichen scharfen Endwert (Abb. 4).

Der Abbau des Prokollagens erfolgte wie auf Seite 60 beschrieben; zusammen mit dem Trypsin wurde jedoch die gleiche Menge Chymotrypsin der Prokollagensuspension zugegeben. Aus der Titrationskurve (Abb. 4) ist ersichtlich, daß ein Trypsin-Chymotrypsin-Gemisch bei Annahme von 216 Aminosäuren pro kleinste Prokollageneinheit (Tab. 1, S. 19)

etwa 17 Bindungen im Molekül spaltet; unter Voraussetzung eines Molekulargewichtes von 360000 für ein Kollagenmonomeres sind etwa 260 Peptide mit einer mittleren Kettenlänge von 12 Aminosäuren zu erwarten.

Für die Trennung der durch diesen enzymatischen Abbau von Prokollagen erhaltenen Peptide verwendete ich wieder die kontinuierliche

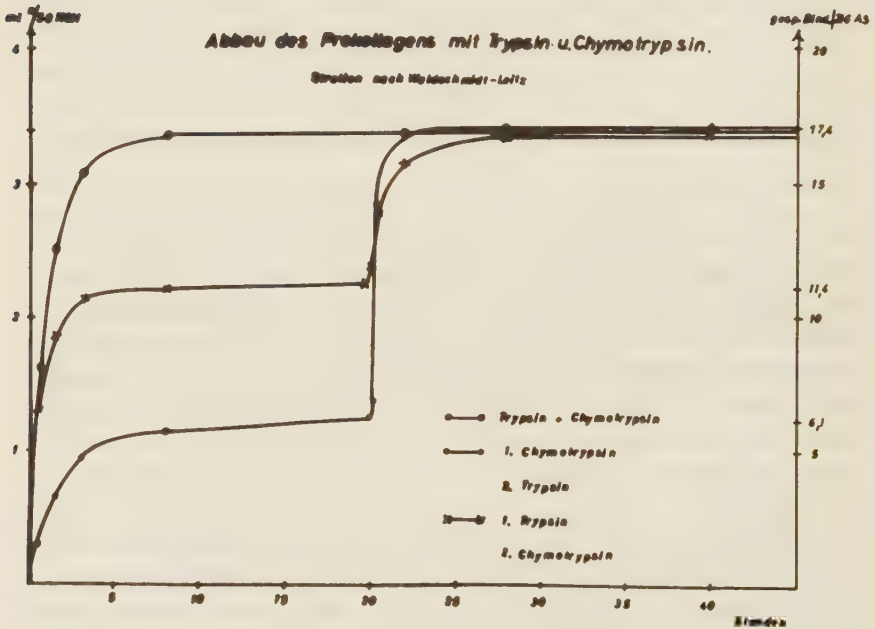


Abb. 4. Abbau des Prokollagens mit Trypsin und Chymotrypsin. Titration der freigesetzten Carboxylgruppen nach Waldschmidt-Leitz.

Elektrophoreseanordnung nach GRASSMANN-HANNIG (37). Die Verteilung der unter den gleichen Bedingungen (pH 4,9, 600 V, 20 mA) wie in Abschnitt I (S. 15) erhaltenen ninhydrinpositiven Komponenten geht aus Abb. 5 hervor; die erzielte Trennung ist nicht sehr scharf (vgl. z. B. mit Abb. 11, S. 40). Nach einer recht groben Einteilung in eine

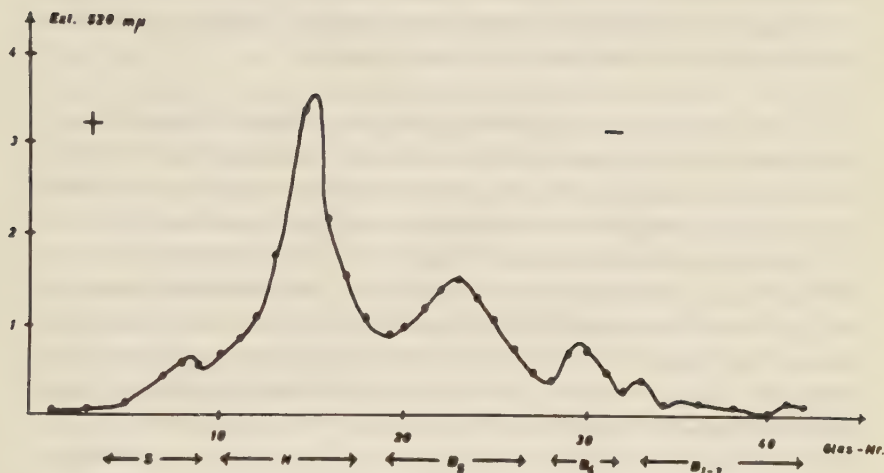


Abb. 5. Verteilung der mit Ninhydrin angefärbten Fraktionen nach der elektrophoretischen Trennung des tryptisch-chymotryptischen Abbaugesamisches von Prokollagen in Pyridin-Essigsäure-Puffer; pH 4,9, 600 V, 20 mA, Papier Schleicher & Schüll 604L/90g.

S-, N- und B-Fraktion versuchte ich, die S-Fraktion bei pH 4,9 elektrophoretisch einheitlich zu erhalten, was nach zahlreichen Trennungen auch gelang. Erwartungsgemäß spaltete sich die bei pH 4,9 einheitliche Fraktion S bei pH 2,4 elektrophoretisch in weitere Komponenten auf, die, jede für sich, wiederum bis zur elektrophoretischen Einheitlichkeit bei pH 2,4 getrennt wurden; die anschließende papierchromatographische Reinheitsprüfung zeigte, daß jede der nach zahlreichen Trennungen elektrophoretisch reinen S-Fractionen noch aus zwei bis acht Komponenten bestand. Ich brach daraufhin die weitere Aufarbeitung dieses Prokollagenabbaus ab, da aus dem unter Abschnitt I beschriebenen Vorversuch zu ersehen war, daß sich die Reinigung der Fraktionen N und B noch schwieriger gestalten würde.

Zusammenfassend kann zu diesem Versuch gesagt werden, daß durch den Abbau des Prokollagens mit einem Gemisch aus Trypsin und Chymotrypsin eine größere Anzahl Peptide entsteht als bei einem Abbau mit Trypsin allein; ferner kann aus den zahlreichen wenig erfolgreichen

Reinigungsversuchen geschlossen werden, daß die entstandenen Peptide in ihrer Polarität so ähnlich sind, daß sie sich elektrophoretisch nicht einmal annähernd trennen lassen.

Vor allem haben mir die als Vorversuche zu wertenden Abbauten des Prokollagens mit Trypsin (Abschnitt I) bzw. Trypsin + Chymotrypsin (Abschnitt II) gezeigt, daß es nicht möglich ist, mit Hilfe der Papierelektrophorese allein ein so kompliziertes Peptidgemisch, wie es bei solchen Abbauversuchen auftritt, in seine einzelnen Komponenten restlos aufzutrennen in der Hoffnung, die einzelnen Fraktionen auf diesem Wege schließlich einheitlich gewinnen zu können. Um eine größere Anzahl einheitlicher Abbaupeptide gewinnen zu können, mußte ich erst nach anderen Möglichkeiten zur Reinigung dieser Fraktionen suchen (vgl. Abschnitt IV).

Ferner geht aus den Vorversuchen hervor, daß ein Abbau von Prokollagen mit einem Trypsin-Chymotrypsin-Gemisch noch wesentlich schwieriger aufzuarbeiten scheint, als der Abbau von Prokollagen mit Trypsin allein; da das im Handel erhältliche, heute im allgemeinen nach KUNITZ und NORTHROP (43,44) hergestellte Trypsin nicht frei von anderer proteolytischer Aktivität ist (45 - 47) (vgl. folgenden Abschnitt)⁺, andererseits jedoch für enzymatisch einwandfreie Abbauversuche ein von fremder proteolytischer Aktivität freies Trypsin mir notwendig erschien, suchte ich zunächst nach einer Methode, Trypsin unter Erhaltung seiner eigenen Aktivität von anderen proteolytischen Aktivitäten zu reinigen.

III. Versuche zur Reinigung von Trypsin

Aus den oben angeführten Gründen war für meine Untersuchungen die Verwendung eines von Chymotrypsinspuren völlig befreiten Trypsins notwendig.

* In einer Aussprache mit leitenden Herren der Firma NOVO-Industrie, Kopenhagen, konnte ich erfahren, daß es nicht möglich ist, bei der technischen Herstellung des Trypsins das Chymotrypsin vollkommen quantitativ abzutrennen.

NORTHROP und KUNITZ (48,49) hatten bereits Mitte der dreißiger Jahre ein Verfahren angegeben, um ein Trypsinpräparat von Chymotrypsinaktivität zu befreien. Danach löst man das Trypsin-Chymotrypsin-Gemisch in 0,16 n Salzsäure und beläßt die Lösung 24 Stunden in einem Wasserbad von 37° C, wobei das Chymotrypsin inaktiviert wird, während die Aktivität des Trypsins weitgehend erhalten bleiben soll. Vorversuche⁺ nach diesem Verfahren ergaben, daß zwar nach der Salzsäurebehandlung des Trypsins keine Chymotrypsinaktivität mehr zu messen ist, andererseits jedoch auch ein Verlust an Trypsinaktivität von ca. 50 % in Kauf genommen werden muß. Ein anderes Verfahren zur Inaktivierung von Chymotrypsin in Gegenwart von Trypsin beruht auf der unterschiedlichen Stabilität dieser beiden Enzyme gegenüber Harnstoff (49); eigene Experimente wurden zu dieser Methode nicht unternommen, da die hierfür notwendigen beträchtlichen Harnstoffmengen die Durchführung der weiteren Untersuchungen erschwert hätten.

Obwohl man mit diesen beiden Methoden zu dem gewünschten Erfolg kommen kann, haben sie vor allem den Nachteil, daß man stets nur zu einem von anderen Begleitproteinen nicht freien Trypsin kommt. Ich suchte daher noch nach einem anderen Verfahren, Chymotrypsin von Trypsin zu trennen, und zwar im präparativen Maßstab.

1. Versuche zur säulenchromatographischen Reinigung von Trypsin

Nachdem MOORE und STEIN (50) die chromatographische Reinigung einiger Enzyme wie Ribonuclease, Lysozym, Chymotrypsinogen und Chymotrypsin an Ionenaustauschersäulen IRC-50 (vgl. Fußnote S. 41) beschrieben hatten, versuchte ich zunächst unter den gleichen Bedingungen (S. 89) die Reinigung eines käuflichen Trypsinpräparates. Das säulenchromatographische Verhalten von Trypsin und Chymotrypsin ist in Abb. 6 graphisch dargestellt; die Trennung ist sehr unbefriedigend; die Eiweißausbeute betrug nur etwa 30 %, und die proteolytische Ak-

⁺ Für die freundliche Überlassung der Trypsin- und Chymotrypsin-Präparate für diese Untersuchungen bin ich der Firma NOVO-Industrie, Kopenhagen, zu besonderem Dank verpflichtet.

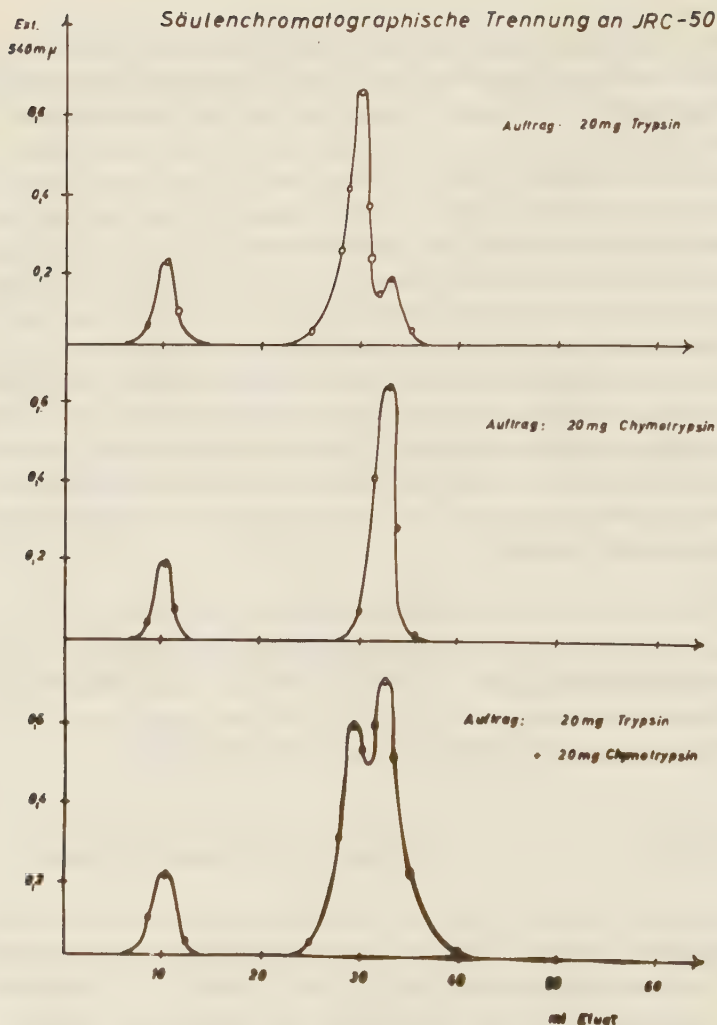


Abb. 6. Versuch zur Trennung von Trypsin und Chymotrypsin am Ionenaustauscher IRC-50. Elutionsmittel: 0,2 M Phosphatpuffer pH 5,67. Verteilung der mit Ninhydrin angefärbten Fraktionen.

tivität beider Enzyme ging verloren. - Die ninhydrinpositive Komponente, die nach 10 ml auftrat, war ebenfalls enzymatisch unwirksam und wurde nicht näher untersucht.

Das negative Ergebnis der Reinigung des Trypsins auf säulenchromatischem Wege steht in Übereinstimmung mit einer während der Durchführung meiner Arbeiten erschienenen Veröffentlichung von TALLAN (51); dagegen gelang es ihm - und unabhängig von ihm auch KELLER und Mitarbeitern (52) - Trypsinogen mittels dieser Methode an Ionenaustauschersäulen zu reinigen.

2. Versuche zur elektrophoretischen Reinigung von Trypsin (31)

Für die weiteren Untersuchungen zur Reinigung des Trypsins verwendete ich die kontinuierliche Papierelektrophorese-Anordnung (37). Im pH-Bereich 2,3 bis 5,5 (Puffer: 0,5 n Essigsäure; Acetatpuffer; Pyridin-Eisessig-Puffer) konnte ich keine befriedigende Trennung der

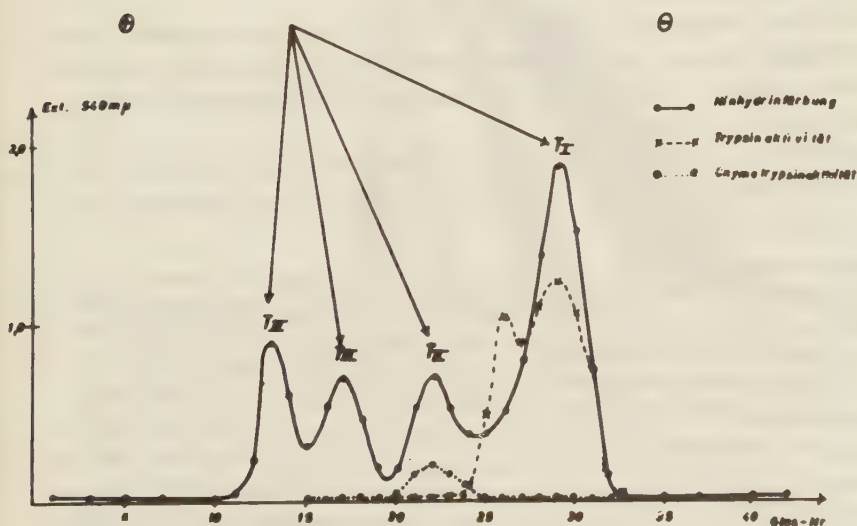


Abb. 7. Verteilung der mit Ninhydrin angefärbten Fraktionen und deren Aktivitäten nach der elektrophoretischen Trennung von handelsüblichem Trypsin in Pyridin-Essigsäure-Puffer; pH 6,1, 520 V, 26 mA, Papier Schleicher & Schüll 2040a.

beiden Fermentproteine erreichen. Versuche im alkalischeren Bereich (pH 6,9 - 8,5; Puffer: Pyridin-Eisessig-Puffer; Veronal-Puffer) führten zu schlechten Trennergebnissen und zu Verlusten an Aktivität bis zu 100 %. Dagegen erwies sich ein Pyridin-Eisessig-Puffer vom pH 6,1 zur Abtrennung des Chymotrypsins vom Trypsin als sehr gut geeignet. In Abb. 7 zeigt die ausgezogene Kurve die Verteilung der ninhydrinpositiven Komponenten nach der elektrophoretischen Trennung des Trypsinpräparates "Trypure-Novo" in der kontinuierlichen Elektrophoreseanordnung bei pH 6,1 und der Feldstärke 13 V/cm. Neben einer stark kathodisch wandernden Hauptfraktion (T_{II}) sind noch deutlich drei andere ninhydrinpositive Komponenten erkennbar. - Die Trypsinaktivität wurde mit aliquoten Teilen der nach der elektrophoretischen Trennung aufgefangenen Lösungen mit N^{α} -Benzoyl-DL-arginin-8-naphthylamid-hydrochlorid als Substrat (53) (gestrichelte Kurve), die Chymotrypsinaktivität entsprechend mit dem Substrat N^{α} -Benzoyl-DL-phenylalanin-8-naphthylamid (54) (punktierte Kurve) ermittelt (S. 91).

Aus einem Vergleich der Aktivitätskurven mit der Ninhydrinkurve geht eindeutig hervor, daß die Chymotrypsinaktivität der mit T_{II} bezeichneten Komponente zuzuordnen ist, während die Trypsinaktivität der Komponente T_I entspricht.

Auffallend im Kurvenverlauf der Trypsinaktivität ist das Auftreten eines Doppelgipfels, der in weiteren Versuchen stets eindeutig reproduziert werden konnte.

Diese Heterogenität des Trypsins ist auch von anderen Autoren bei elektrophoretischen Untersuchungen (47,55 - 60) dieses Enzyms festgestellt worden. Allerdings befaßt sich keine dieser Untersuchungen mit der präparativen Abtrennung des Chymotrypsins vom Trypsin. So berichten NORD und BIER (59), die in freier Elektrophorese unter Verwendung eines Natriumacetatpuffers arbeiteten, daß in Abwesenheit einer stabilisierenden Konzentration von Calciumionen Trypsin im pH-Bereich zwischen 4 und 5 elektrophoretisch homogen ist, während bei Anwesenheit von Calciumionen (0,033 m) in diesem pH-Bereich zwei elektrophoretisch zu unterscheidende Komponenten festgestellt werden können. Die beiden Komponenten konnten von NORD und BIER in geringen Mengen isoliert werden; sie hatten ähnliche proteolytische Aktivität. Bei pH 3,5 und pH 5,5 fanden sie das Trypsin - auch bei Zusatz von Calciumionen - homogen.

PERRONE und Mitarbeiter berichteten in einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung (60) ebenfalls über die elektrophoretische Heterogenität des Trypsins; sie untersuchten das elektrophoretische Verhalten unter Verwendung einer Elektrophoreseanordnung nach DURRUM

(61) in einem Ameisensäure-Pyridin-Puffer vom pH 2,3 bis 2,8 mit und ohne Calciumzusatz. Bei pH 2,3 hat das Trypsin seine größte Stabilität, d. h., hier sind keine durch Selbstverdauung entstandenen Abbauprodukte zu erwarten. Beim Testen auf ninhydrinpositive Komponenten fanden die Autoren nur ein Maximum, während sie bei der Prüfung auf Trypsinaktivität nach CHARNEY und TOMARELLI (62) - auch ohne Calciumzusatz bei der elektrophoretischen Untersuchung - eindeutig zwei Maxima mit proteolytischer Aktivität fanden. Nach meinen Ergebnissen kann allerdings in diesem pH-Bereich eine präparative Abtrennung des Chymotrypsins vom Trypsin nicht erreicht werden (S. 32).

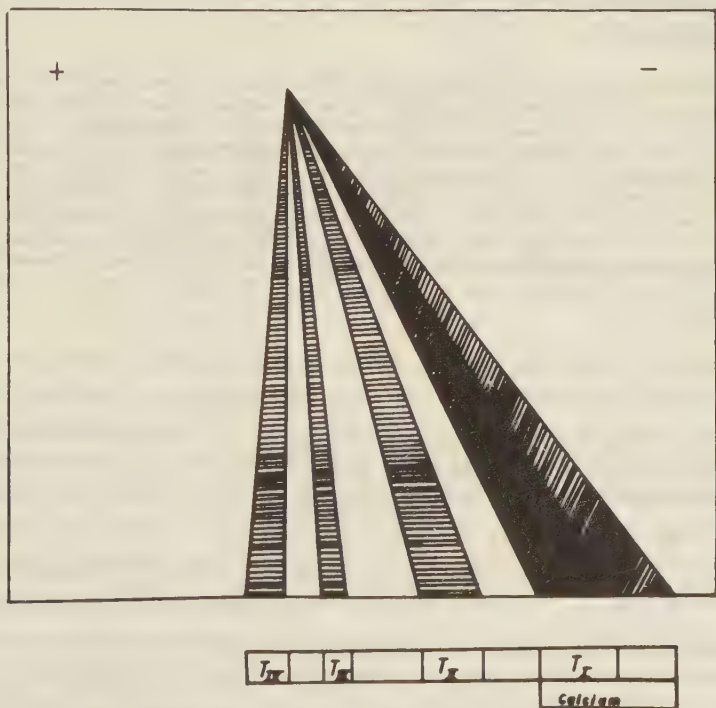


Abb. 9. Schematische Darstellung des elektrophoretischen Verhaltens von Trypsin und Calcium in Pyridin-Essigsäure-Puffer; pH 6,1, 520 V, 26 mA, Papier Schleicher & Schüll 2040a. Erläuterung in Text.

Bei meinen elektrophoretischen Versuchen bei pH 6,1 war ein Zusatz von Calcium- oder anderen divalenten Ionen zur Erhaltung der Trypsinaktivität (55,56,63 - 67) ebenfalls nicht erforderlich, wie dies z. B. bei den elektrophoretischen Reinigungsverfahren von Arginase (40,41) und Enolase (68,69) notwendig war; durch geeignete Kontrollversuche konnte nämlich festgestellt werden, daß Calciumionen sowohl allein als auch in Gegenwart von Trypsin mit ähnlicher elektrophoretischer Beweglichkeit wie die aktive Trypsinkomponente wanderten (Abb. 8).

Es wurde eine 0,033 m Calciumchloridlösung unter den oben für die elektrophoretische Reinigung des Trypsins angegebenen Bedingungen in der kontinuierlichen Elektrophoreseanordnung untersucht. Nach dem Trocknen des Bogens konnte der Wanderungsweg der Calciumionen durch Besprühen mit Violursäure (70) sichtbar gemacht werden. In Parallelversuchen stellte ich zwei Pherogramme durch Auftrennung eines Gemisches von Trypsin und 0,033 m Calciumchloridlösung unter obigen Bedingungen her; ein Bogen wurde mit Ninhydrinreagenz, der zweite Bogen mit Violursäure besprüht. Die Ergebnisse dieser drei Versuche deckten sich gut und sind in Abb. 8 schematisch dargestellt.

Um möglichst reine von anderen Begleitproteinen freie Fraktionen nach der elektrophoretischen Trennung des Trypsins zu erhalten, wurden die einzelnen Zonen auf Grund der in Abb. 7 wiedergegebenen Verteilungskurven scharf abgegrenzt gesammelt, wobei die Zwischenfraktionen vernachlässigt wurden; T_I : Glas 26 - 31; T_{II} : Glas 21 - 23; T_{III} : Glas 16 - 18; T_{IV} : Glas 12 - 14. Nach dem Abfüllen der Fraktionen mußten die Lösungen sofort eingefroren und gefriergetrocknet werden, um gut lösliche und hoch aktive Präparate zu erhalten.

Wie aus einem Vergleich der Ninhydrinverteilungskurve mit den Aktivitätskurven (Abb. 7, S. 32) hervorgeht, besitzen die Fraktionen T_{III} und T_{IV} weder tryptische noch chymotryptische Aktivität. Ich vermute, daß diese beiden Fraktionen Abbauprodukte des Trypsins sind, da in dem pH-Bereich, in dem ich meine elektrophoretischen Untersuchungen durchführte, das Trypsin bereits der Autolyse unterliegt (44,46,71,72). Diese Vermutung erhält eine Bestätigung dadurch, daß bei nochmaliger Untersuchung der scharf aufgefangenen Fraktion T_I die Komponenten T_{III} und T_{IV} , wenn auch in geringerer Konzentration, an denselben Stellen auftreten (Abb. 9); eine zweite und dritte Relektrophorese von T_I zeigte mit Abb. 9 identische Ergebnisse.

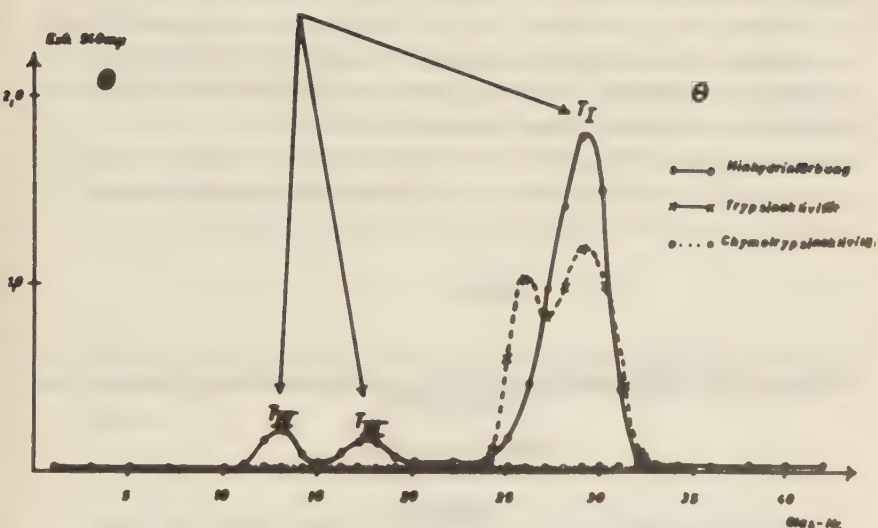


Abb. 9. Verteilung der mit Ninhydrin angefärbten Fraktionen und deren Aktivitäten nach der Reelektrophorese von Fraktion T_I (vgl. Abb. 7) in Pyridin-Essigsäure-Puffer; pH 6,1, 520 V, 26 mA, Papier Schleicher & Schüll 2040a.

Die Fraktionen T_{III} und T_{IV} findet man dagegen bei reelektrophoretischen Untersuchungen einheitlich.

Um die vermutete Autolyse einzuschränken, versuchte ich, die elektrophoretische Trennung bei 4°C durchzuführen. Die Ausbeuten an den nicht aktiven Komponenten T_{III} und T_{IV} wurden aber dabei nicht wesentlich geringer gefunden.

Wie aus Abb. 9 weiter hervorgeht, wurde bei der Prüfung von T_I auf Trypsin- und Chymotrypsinaktivität nur noch Trypsinaktivität gefunden (gestrichelte Kurve). - Auch nach zweimaliger Elektrophorese der Fraktion T_I tritt aber wieder an gleicher Stelle in der Aktivitätskurve der Doppelgipfel auf.

Die Ausbeuten der nach der Gefriertrocknung aus der ersten elektrophoretischen Trennung erhaltenen reinen Fraktionen sowie die entsprechenden Ausbeuten an tryptischer Aktivität, gemessen nach ANSON (73)

sowie nach RIEDEL und WÜNSCH (53), sind in der Tabelle 9 zusammengestellt. Danach beträgt die Gesamtausbeute der Fraktionen T_I bis T_{IV} , bezogen auf mg Protein-N, 72,5 %. Berücksichtigt man auch noch die zwischen den einzelnen Komponenten liegenden Zwischenfraktionen, die getrennt behandelt wurden, so kommt man auf eine Stickstoffausbeute der elektrophoretischen Trennung von 95 %.

Die Ausbeute an wieder gefundener Aktivität liegt bei etwa 40 %; diese verhältnismäßig geringe Ausbeute ist darauf zurückzuführen, daß man bei der Elektrophorese - außer durch die scharfe Abtren-

Tabelle 9

Substanz- und Aktivitätsausbeuten bei der elektrophoretischen Trennung von Trypure-Novo.

**300 mg Trypure-Novo
stabilisiert, krist.**

entspricht

44,5 mg Protein-N

7,6 Anson-Einheiten (AE)²⁵

9678,8 Trypsin-Einheiten (TE)¹²

= 0,171 AE/mg Protein-N

= 217,5 TE/mg Protein-N

Elektrophorese bei pH 6,1; 13 V/cm

	⊕  ⊖				
Ausbeuten	T IV	T III	T II	T I	Summe
in mg	37,2	39,1	39,6	98,0	213,9
in mg Protein-N	5,53	5,77	5,98	14,90	32,18
in % Protein-N	12,5	13,0	13,5	33,5	72,5
in AE	0	0	0	3,03	
in AE/mg Protein-N	0	0	0	0,203	
in TE	0	0	0	3821,9	
in TE/mg Protein-N	0	0	0	256,5	

nung der Fraktionen - durch Autolyse einen gewissen Aktivitätsverlust in Kauf nehmen muß. Dagegen ist die Aktivität der gereinigten Komponente T_I , wie ebenfalls aus der Tabelle 9 hervorgeht - bezogen auf 1 mg Protein-N - um etwa 19 % höher als diejenige des Ausgangs-

materials. - Die nach der Methode von ANSON und nach dem Aktivitätstest von RIEDEL und WÜNSCH ermittelten Werte stehen in guter Übereinstimmung.

Mit einem so erhaltenen Trypsinpräparat wurde ein Spaltungsversuch an 200 mg Prokollagen unter den auf Seite 68 beschriebenen Bedingungen durchgeführt; wie zu erwarten war, konnte bei einer Carboxylendgruppenbestimmung am Gesamtabbaugemisch lediglich Lysin und Arginin C-terminal festgestellt werden.

IV. Aufarbeitung eines mit gereinigtem Trypsin erhaltenen Abbaugemisches von Prokollagen und Charakterisierung der isolierten Peptide

1. Abbau des Prokollagens mit gereinigtem Trypsin

Frisch hergestelltes Prokollagen (S. 66) wurde, wie auf Seite 68 beschrieben, mit elektrophoretisch gereinigtem und anschließend noch mit 0,16 n Salzsäure behandeltem Trypsin (vgl. Abschnitt III) abgebaut. Die durch Verfolgung des Abbaus nach Waldschmidt-Leitz erhaltene Titrationskurve (Abb. 10) entsprach der in Abschnitt I (S. 14) bereits beschriebenen. Obwohl der Abbau auch auf Grund dieser Kurve nach 4 Stunden beendet zu sein schien, beließ ich das Prokollagen-Trypsin-Gemisch noch weitere 12 Stunden im Wasserbad von 37° C (vgl. dazu S. 13)

2. Trennung und Reinigung der Peptide

a) Elektrophoretische Trennung des Abbaugemisches bei pH 4,9

Das aus dem tryptischen Abbau von 62 g Prokollagen erhaltene Peptidgemisch wurde in der von K. HANNIG (1958) entwickelten sehr leistungsfähigen VAP-Apparatur (32) papierelektrophoretisch kontinuierlich bei pH 4,9, einer Feldstärke von 30 V/cm und 260 mA in eine

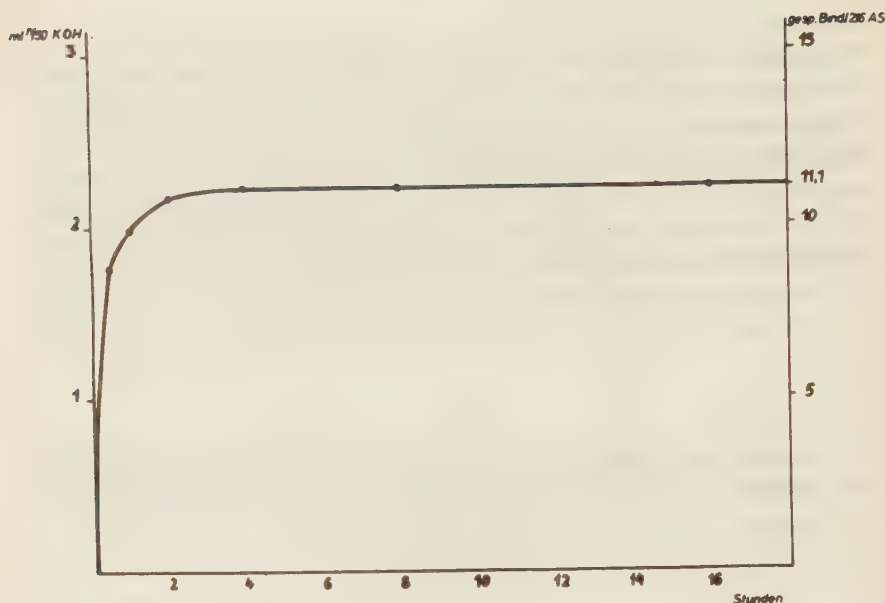


Abb. 10. Abbau des Prokollagens mit gereinigtem Trypsin. Titration der freigesetzten Carboxylgruppen nach Waldschmidt-Leitz.

saure, eine neutrale und in fünf basische Gruppen aufgetrennt. Die Verteilung der getrennten und in den Gläschen aufgefangenen Fraktionen geht aus Abb. 11 hervor; um die Verteilungskurven auch quantitativ auswerten zu können, wurden die aus den Gläschen entnommenen Proben zunächst mit Natronlauge hydrolysiert (nach MOORE und STEIN (74)) und dann mit Ninhydrin getestet (S. 69). - Es wurden pro Tag 3 g Abbaugemisch getrennt; durch wiederholtes Testen konnte festgestellt werden, daß während der gesamten kontinuierlich durchgeführten Trennung die gleichen Fraktionen stets in die gleichen Gläschen liefen. Die aufgefangenen Fraktionen wurden unter den gleichen Bedingungen noch mehrmals in der VAP-Apparatur gereinigt, bis sie bei pH 4,9 elektrophoretisch einheitlich erschienen. Die Ausbeuten der nach mehrmaliger elektrophoretischer Reinigung bei pH 4,9 erhaltenen Fraktionen gehen ebenfalls aus Abb. 11 hervor.

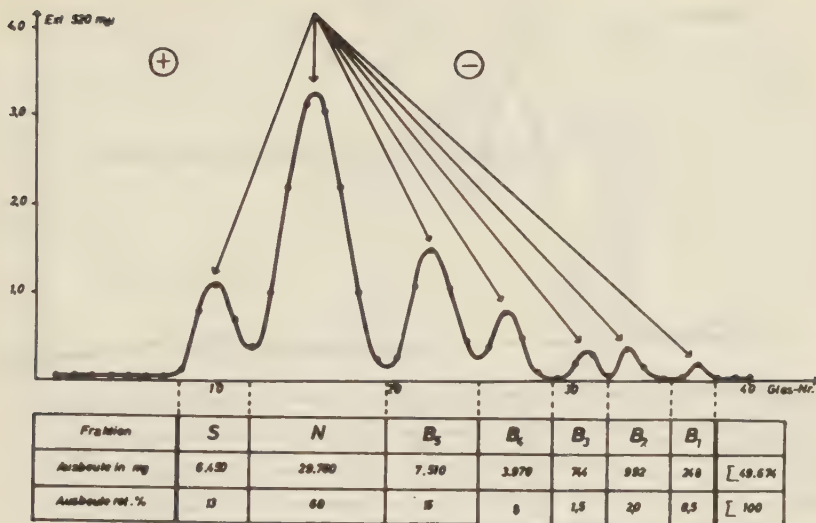


Abb. 11. Verteilung der mit Ninhydrin angefärbten Fraktionen und deren Ausbeuten nach der elektrophoretischen Trennung des tryptischen Abbaugemisches von Prokollagen (62 g) in Pyridin-Essigsäure-Puffer; pH 4,9, 1200 V, 175 mA, Papier Binzer 230.

b) Untersuchungen an der aus der elektrophoretischen Trennung bei pH 4,9 erhaltenen S-Fraktion

Die nach wiederholter elektrophoretischer Reinigung bei pH 4,9 erhaltene S-Fraktion - bei pH 4,9 elektrophoretisch einheitlich - wurde zunächst elektrophoretisch bei pH 2,4 weiter getrennt. Die Verteilung der ninhydrinpositiven Komponenten zeigt Abb. 12. Es treten im wesentlichen zwei Hauptkomponenten - S_I und S_{II} - auf; die Verteilung ist nicht sehr befriedigend; die kleinen NebenkompONENTEN wurden ungetrennt gesammelt und später säulenchromatographisch untersucht (S. 43).

Nach mehrmaligem elektrophoretischem Trennen bei pH 2,4 erhielt ich die Fraktionen S_I (1298 mg) und S_{II} (989 mg) elektrophoretisch einheitlich.

Zur weiteren Reinigung der papierchromatographisch noch sehr uneinheitlichen S-Fractionen verwendete ich hier erstmals die Säulenchromatographie. Aus der Literatur waren bereits zahlreiche Beispiele zur Trennung von Di- bis Hexapeptiden sowie von Proteinen,

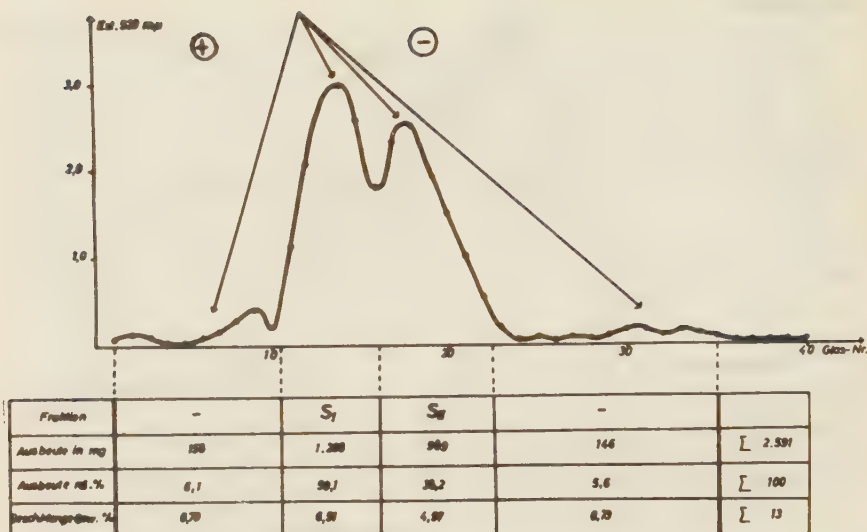


Abb. 12. Tryptisches Abbaugemisch von Prokollagen. Verteilung der mit Ninhydrin angefärbten Fraktionen und deren Ausbeuten nach der elektrophoretischen Trennung von Fraktion S in 0,5 n Essigsäure; pH 2,4, 770 V, 15 mA, Papier Schleicher & Schüll 604L/90g.

jedoch nicht von Abbaupeptiden, wie sie in unserem Falle vorliegen (10 - 100 Aminosäuren), bekannt. Zahlreiche Vorversuche, die ich mit der Fraktion S_I sowohl nach dem Verfahren von BOARDMAN und PARTRIDGE (75) an Amberlite IRC-50⁺ als auch nach dem von MOORE und STEIN angegebenen Verfahren (50,76 - 81) an Dowex 50⁺ unter den verschiedensten Bedingungen durchführte, ergaben keine papierchromatographisch einheitlichen Peptide und große Substanzverluste. - Erst die Einführung des Anionenaustauschers Dowex 1 x 2⁺ (82) ermöglichte es mir, die Fraktion S_I zu reinigen. Nach der Trennung und Rechromatographie (Abb. 13) der noch verbliebenen 80 mg S_I und nach anschließendem Entsalzen, ebenfalls an Dowex 1 x 2 (83,84) (S. 72), erhielt ich zwei Peptide mit der Bezeichnung S₈₆ (23 mg) und S₇₈ (6 mg), die papier-

⁺ IRC-50: schwach saurer Kationenaustauscher, Polymethacrylsäure

Dowex 50: stark saurer Kationenaustauscher, Polystyrol mit Sulfosäuren

Dowex 1: stark basischer Anionenaustauscher, Polystyrol mit quarternären Ammoniumgruppen

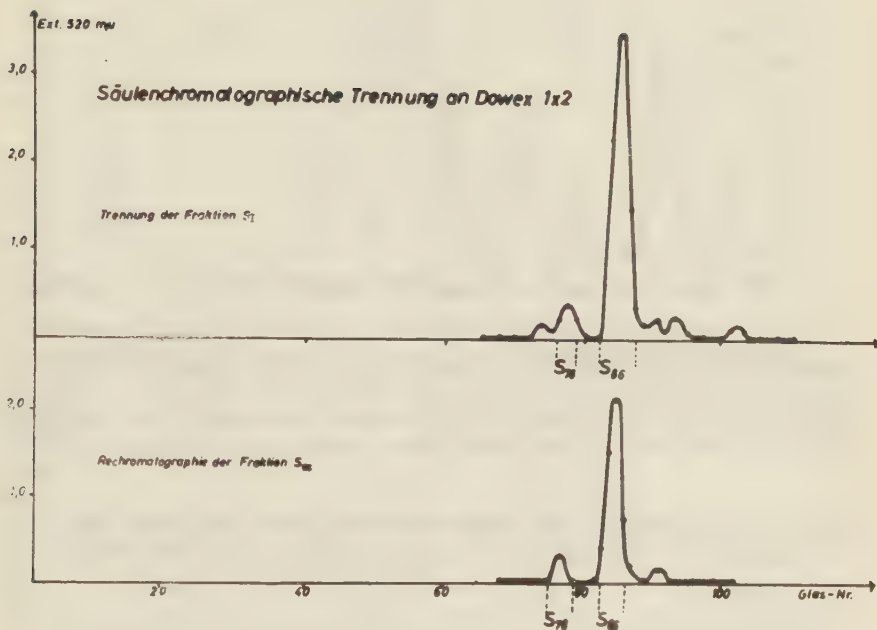


Abb. 13. Obere Kurve: Verteilung der mit Ninhydrin angefärbten Fraktionen nach der säulenchromatographischen Trennung von Fraktion S_I an Dowex 1 x 2.

Untere Kurve: Verteilung der mit Ninhydrin angefärbten Fraktionen nach der Rechromatographie der aus der oberen Kurve erhaltenen Fraktion S₈₆ an Dowex 1 x 2. Versuchsbedingungen Seite 71.

chromatographisch und auf Grund der aus der Aminosäureanalyse erhaltenen guten stöchiometrischen Verhältnisse (Tab. 11, S. 52) als einheitlich bezeichnet werden konnten.

Die Fraktion S_{II} wurde zusammen mit den nicht näher bezeichneten kleinen Nebenfraktionen aus der elektrophoretischen Trennung bei pH 2,4 (vgl. Abb. 12) ebenfalls am Dowex 1 x 2 weiter aufgetrennt; die Verteilung der ninhydrinpositiven Komponenten geht aus Abb. 14 hervor. Von den acht erhaltenen Fraktionen konnten nach dem Entsalzen an "Sephadex" ((85), S. 73) vier Peptide (S₁, S₂, S₄, S₅) als einheitlich bezeichnet und, soweit es die Ausbeuten erlaubten, näher untersucht werden. Die Fraktionen S₃, S₆, S₇ und S₈ enthielten noch mehrere Komponenten; auf ihre Rechromatographie mußte wegen der geringen Ausbeuten verzichtet werden (vgl. Tab. 10, S. 50).

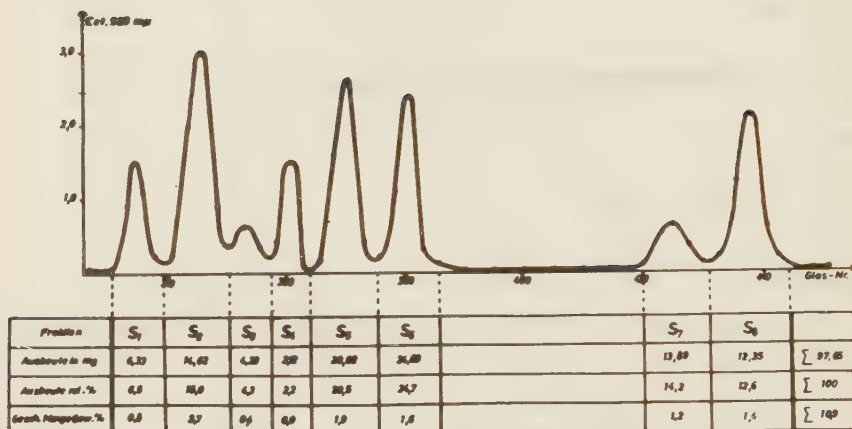


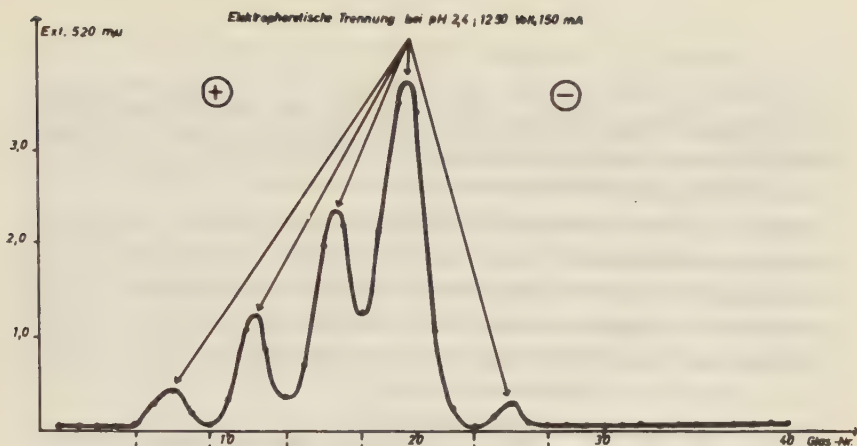
Abb. 14. Verteilung der mit Ninhydrin angefärbten Fraktionen und deren Ausbeuten nach der säulenchromatographischen Trennung von Fraktion S_{II} an Dowex 1 x 2. Versuchsbedingungen S. 71.

c) Untersuchungen an der aus der elektrophoretischen Trennung bei pH 4,9 erhaltenen N-Fraktion

Die aus der elektrophoretischen Trennung bei pH 4,9 gewonnene und bei diesem pH einheitliche Fraktion N (vgl. Abb. 11) wurde zunächst bei pH 2,4 in der VAP-Apparatur weiter aufgetrennt. Das Ergebnis geht aus Abb. 15 hervor; wegen Überschneidens der einzelnen Gipfel war keine quantitative Trennung der Komponenten möglich, weswegen nur eine grobe Unterteilung in fünf Fraktionen, nämlich N_a bis N_e, vorgenommen wurde; die einzelnen Fraktionen wurden nicht mehr re-elektrophoretisiert, sondern gleich zur weiteren Reinigung - jede für sich - auf eine mit Dowex 1 x 2 gefüllte Säule aufgetragen.

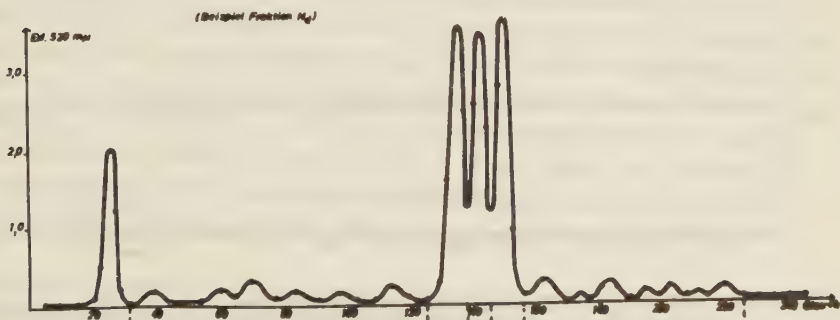
Abb. 16 zeigt die Verteilung der ninhydrinpositiven Komponenten aus der Trennung der mengenmäßig stärksten Fraktion N_d, während in Abb. 17 schematisch die Trennungen für jede der N-Fraktionen wiedergegeben ist. Aus Abb. 17 ist ersichtlich, daß jede Fraktion - wie zu erwarten war - noch mit Bestandteilen ihrer NebenkompONENTEN verunreinigt ist.

Die Tatsache, daß sich einzelne Komponenten bei elektrophoretischen Trennungen - auch wenn diese wiederholt durchgeführt werden - nicht



Fraktion	N_0	N_1	N_2	N_3	N_4	
Ausbeute in mg	340	1.040	2.540	4.425	170	Σ 8.515
Ausbeute rel. %	4	12	30	52	2	Σ 100
Geacht. Menge Gew. %	2,4	7,2	18,0	31,2	1,2	Σ 60

Abb. 15. Tryptisches Abbaugemisch von Prokollagen. Verteilung der mit Ninhydrin angefärbten Fraktionen u. deren Ausbeuten nach der elektrophoretischen Trennung von Fraktion N in 0,5 n Essigsäure; pH 2,4, 1250 V, 150 mA, Papier Binzer 230.



Fraktion	N_1	N_2	N_3	N_4	N_5	N_6	
Ausbeute in mg	322	281	418	422	440	394	Σ 2.100
Ausbeute rel. %	15,0	11,7	19,3	19,1	20,0	18,1	Σ 100
Geacht. Menge Gew. %	0,0	7,0	11,0	11,0	12,0	6,5	Σ 60

Abb. 16. Verteilung der mit Ninhydrin angefärbten Fraktionen nach der säulenchromatographischen Trennung der Fraktion N. Beispiel: Fraktion N_4 . Ionenaustauscher: Dowex 1 x 2. Die angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf die säulenchromatographische Trennung sämtlicher Fraktionen N. (Ausbeuten nach Säulenchromatographie: 2,71)

quantitativ trennen lassen, ist auch schon bei früheren Versuchen häufiger beobachtet worden; durch irgendwelche Affinitäten bleibt ein gewisser Prozentsatz von Begleitkomponenten an der jeweiligen Hauptkomponente haften. Derartige Effekte werden auch bei elektrophoretischen Trennungen von Aminosäuregemischen beobachtet (86).

Nachdem die fünf Fraktionen einzeln unter den gleichen Bedingungen säulenchromatographiert worden waren, wurden die aus jeder Trennung bei dem gleichen Elutionsvolumen erschienenen Fraktionen papierchromatographisch geprüft; obwohl die einzelnen Fraktionen bei dieser Prüfung noch in weitere Komponenten sich auftrennten, konnten die

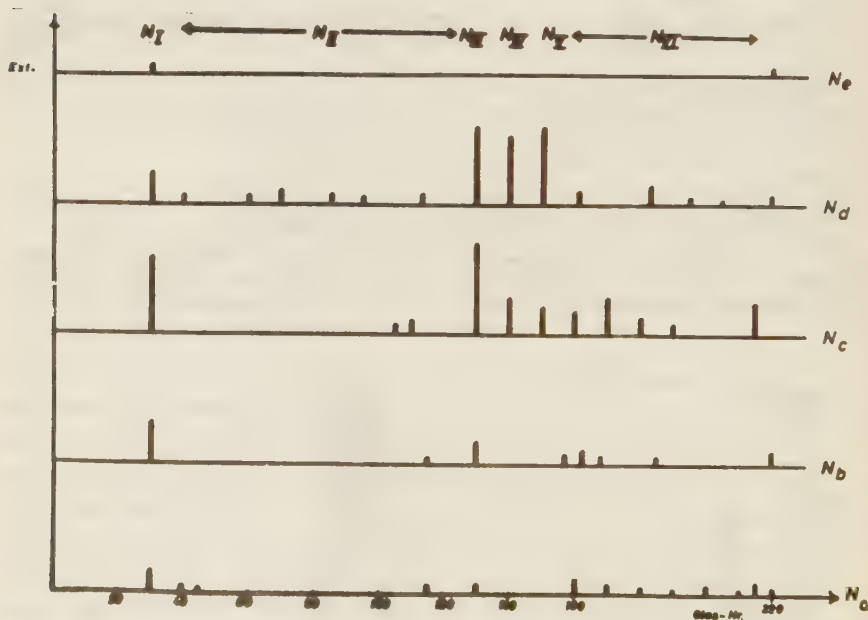


Abb. 17. Schematische Darstellung der Ergebnisse aus den säulenchromatographischen Trennungen der Fraktionen N_a bis N_e .

bei dem jeweils gleichen Elutionsvolumen erschienenen Fraktionen chromatographisch als qualitativ übereinstimmend angesehen und entsprechend vereinigt werden. Zusammenfassend wurden sechs Fraktionen erhalten, die ich mit N_I bis N_{VI} bezeichnete; dabei wurden die zwischen N_I und N_{III} liegenden kleinen Komponenten wegen ihrer geringen Ausbeuten und ihrer nicht immer genügend scharfen Trennung summarisch

als N_{II} , die hinter N_V liegenden Fraktionen als N_{VI} gesammelt.

Fraktion N_I , die bei der beschriebenen Trennung an der Dowex 1 x 2-Säule mit der Front gewandert war, konnte durch Rechromatographie am selben Ionenaustauscher unter etwas abgeänderten Bedingungen (langsamere Durchflußgeschwindigkeit, Sammeln kleinerer Elutionsvolumina, langsamer ansteigender pH-Gradient; vgl. S. 71) in neun weitere Fraktionen (N_{IA} bis N_{IJ}) aufgetrennt werden. Die nach scharfer Abgrenzung gesammelten Fraktionen bestanden aus einer Hauptkomponente, die noch schwach durch Nebenkomponten verunreinigt waren; die jeweiligen Hauptkomponenten konnten papierchromatographisch leicht völlig einheitlich gewonnen werden; lediglich die Fraktionen N_{IB} und N_{IH} konnten durch präparative Papierchromatographie in je zwei Komponenten zerlegt werden, von denen jede bei der Rechromatographie einheitlich war.

Aus Fraktion N_{II} isolierte ich durch Rechromatographie unter etwas abgeänderten Bedingungen (vgl. oben und S. 71) nochmals N_I und N_{III} ; die kleineren Zwischengipfel, die mengenmäßig stark zurücktraten, wurden wegen geringer Ausbeute vernachlässigt.

Fraktion N_{III} konnte nach zweimaliger Rechromatographie an Dowex 1 x 2 als säulenchromatographisch einheitlich bezeichnet werden; papierchromatographisch bestand diese Fraktion jedoch noch aus vier Komponenten, die sich durch präparative Papierchromatographie trennen ließen (N_{IIIIa} bis N_{IIIId}); während N_{IIIIc} und N_{IIIId} papierchromatographisch einheitlich gewonnen werden konnten, lohnte sich auf Grund der geringen Ausbeuten eine weitere Reinigung der noch stark uneinheitlichen Fraktionen N_{IIIIa} und N_{IIIIb} nicht mehr.

Fraktion N_{IV} war nach zweimaliger Rechromatographie an Dowex 1 x 2 ebenfalls säulenchromatographisch einheitlich; durch präparative Papierchromatographie gewann ich aus dieser Fraktion jedoch weitere Komponenten, nämlich N_{IV1} bis N_{IV4} , in papierchromatographisch einheitlicher Form.

Fraktion N_V konnte zwar nach zweimaliger Rechromatographie säulenchromatographisch als einheitlich gelten, bestand aber papierchromatogra-

phisch noch aus drei Komponenten. Es gelang jedoch weder papierchromatographisch noch an einer Chromasäule (Firma LKB), diese drei Komponenten präparativ so zu trennen, daß sie den Reinheitsforderungen entsprachen.

Fraktion N_{VI} ließ sich durch Rechromatographie an Dowex 1 x 2 - ebenfalls unter etwas abgeänderten Bedingungen - in 22 Komponenten (N_{VIa} bis N_{VIx}) auftrennen; auf Grund der in Abb. 18 gezeigten Verteilungskurve der ninhydrinpositiven Komponenten wurden die Fraktionen sehr scharf getrennt aufgefangen, d. h., von jedem Gipfel wurden die Punkte des Maximums, des aufsteigenden Astes und des absteigenden Astes getrennt gesammelt; trotzdem konnten nur wenige Fraktionen nach der säulenchromatographischen Trennung als papierchromatographisch einheitlich bezeichnet werden. Die meisten N_{VI}-Fraktionen bestanden noch aus mehreren Komponenten, von denen ein Teil nach papierchromatogra-

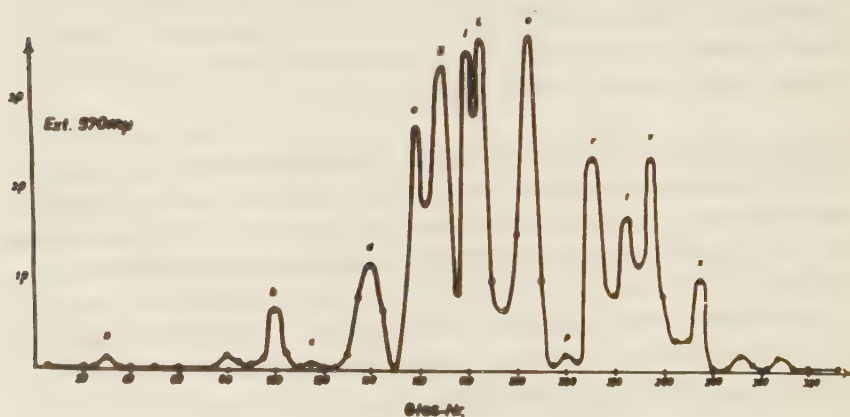


Abb. 18. Verteilung der mit Ninhydrin angefärbten Fraktionen nach der Rechromatographie der Fraktion N_{VI} am Ionenaustauscher Dowex 1 x 2. Versuchsbedingungen S. 71.

phischer Trennung und anschließender Elution als einheitliche Peptide gewonnen werden konnten; eine Anzahl anderer Fraktionen ließ sich wegen zu geringer Ausbeuten nicht mehr endgültig reinigen (vgl. Tab. 10, S. 50).

d) Untersuchungen an der aus der elektrophoretischen Trennung bei pH 4,9 erhaltenen B-Fraktion

Die in der VAP-Apparatur bei pH 4,9 erhaltenen Fraktionen B_1 bis B_5 wurden zur schärferen Reinigung nochmals bei dem gleichen pH-Wert in einer inzwischen von K. HANNIG (1959) weiter entwickelten Apparatur zur trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese (87) reelektrophoretisiert. Die Fraktion B_1 war bereits nach dieser elektrophoretischen Reinigung papierchromatographisch einheitlich. Auf eine weitere Trennung der papierchromatographisch noch uneinheitlichen Fraktionen B_2 bis B_5 bei pH 2,4 wurde verzichtet, da die elektrophoretische Beweglichkeit der in diesen Fraktionen enthaltenen Komponenten bei diesem pH-Wert zu geringe Unterschiede aufwies. Sie konnten jedoch durch Säulenchromatographie an Dowex 1 x 2 unter ähnlichen Bedingungen wie die N-Fractionen (vgl. S. 71) in weitere Komponenten aufgetrennt werden. Abb. 19 zeigt am Beispiel der Fraktion B_4 die säulenchromatographische Auftrennung eines solchen basischen Peptids in zahlreiche weitere Komponenten.

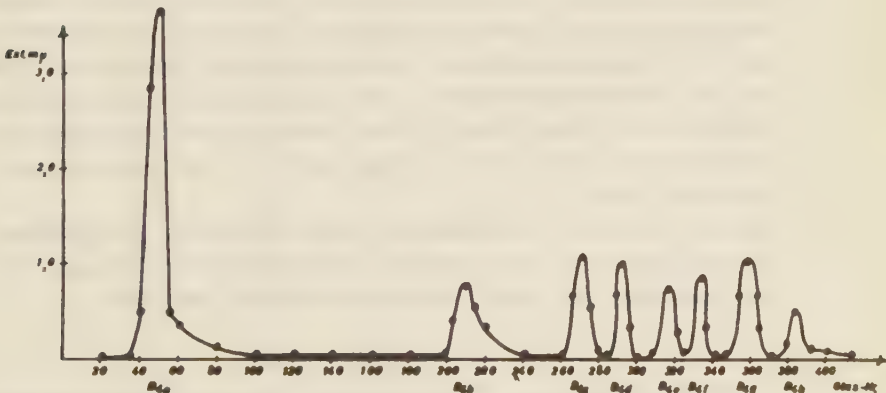


Abb. 19. Verteilung der mit Ninhydrin angefärbten Fraktionen nach der säulenchromatographischen Trennung von Fraktion B_4 an Dowex 1 x 2. Versuchsbedingungen S. 71.

Das nochmaliges Rechromatographieren der so erhaltenen B-Fractionen an Ionenaustauscher Dowex 1 x 2 zu keiner weiteren Trennung führte,

die meisten Peptide jedoch papierchromatographisch noch nicht einheitlich waren, wurden diese säulenchromatographisch einheitlichen Fraktionen nach dem Entsalzen (S. 75) durch papierchromatographische Auftrennung und nachfolgende Elution weiter gereinigt. Einige basische Peptide konnten nach der präparativen Papierchromatographie als chromatographisch einheitlich bezeichnet werden, während die meisten B-Fractionen auch nach diesem Reinigungsschritt trotz scharfer Elution noch immer aus mehreren Komponenten bestanden; auf Grund der geringen Ausbeuten mußte auf eine weitere Reinigung dieser Peptide verzichtet werden (Tab. 10).

e) Zusammenfassung der aus dem beschriebenen Trennungsgang erhaltenen Ergebnisse

Auf Grund des oben beschriebenen Trennungsganges (Elektrophorese, Säulenchromatographie, Papierchromatographie) habe ich eine große Anzahl Peptide isolieren können; sie sind mit ihren wirklichen Ausbeuten und dem geschätzten mengenmäßigen Anteil - berechnet aus den wirklichen Ausbeuten und den Flächenwerten der Extinktionskurven (S. 78) - in Tabelle 10 zusammengestellt. Es wurden insgesamt 114 Peptide gewonnen, von denen 55 (in Tab. 10 unterstrichen) elektrophoretisch und papierchromatographisch für einheitlich befunden wurden; sie repräsentieren unter Zugrundelegung der geschätzten Mengen 55 % des Gesamtabbaugemisches. Soweit die Ausbeuten der isolierten Peptide es zuließen, wurde an ihnen nochmals eine tryptische Spaltung versucht, die jedoch in keinem Falle zu einer weiteren Aufspaltung führte.

Von den einheitlich gewonnenen Peptiden wurden, wie im folgenden beschrieben, 51 in bezug auf ihre Aminosäurezusammensetzung, 18 auf Endgruppen und 10 auf ihre Sequenz weiter untersucht.

3. Bausteinanalyse der in einheitlicher Form gewonnenen Abbaupeptide

a) Aminosäurezusammensetzung

Die nach der elektrophoretischen Trennung, Säulenchromatographie und Papierchromatographie mit anschließender Elution gewonnenen elektrophoretisch und chromatographisch einheitlichen Peptide (in Tab. 10

Tabelle 10. Ausbeuten der aus dem tryptischen Abbau von 62 g Prokollagen gewonnenen Peptide
(Unterstrichene Peptide: elektrophoretisch und chromatographisch einheitlich).

Peptid	mg	%	Peptid	mg	%	Peptid	mg	%	Peptid	mg	%	Peptid	mg	%
<u>S₇₈</u>	6,0	0,40	<u>N_{IA}</u>	4,9	1,10	<u>N_{VIh1}</u>	6,2	0,20	<u>B₁</u>	69,0	0,50	<u>B_{5r}</u>	19,5	2,50
<u>S₈₆</u>	23,0	1,70	<u>N_{IB1}</u>	2,3	0,50	<u>N_{VIh2}</u>	6,6	0,20	<u>B_{2a}</u>	86,4	0,60	<u>B_{5a1}</u>	9,5	1,30
<u>S₁</u>	6,3	0,80	<u>N_{IB2}</u>	1,6	0,40	<u>N_{VIi1}</u>	10,5	0,60	<u>B_{2b}</u>	3,4	0,04	<u>B_{5a2}</u>	13,5	1,90
<u>S₂</u>	14,6	2,70	<u>N_{IC}</u>	4,9	1,10	<u>N_{VIi2}</u>	7,9	0,40	<u>B_{2c}</u>	2,8	0,03	<u>B_{5b}</u>	6,3	0,90
<u>S₃</u>	4,2	0,40	<u>N_{ID}</u>	7,2	1,70	<u>N_{VIk1}</u>	5,4	0,20	<u>B_{2d}</u>	101,9	0,70	<u>B_{5c}</u>	13,0	1,80
<u>S₄</u>	2,1	0,90	<u>N_{IE}</u>	5,5	1,30	<u>N_{VIk2}</u>	4,1	0,10	<u>B_{2e}</u>	77,7	0,50	<u>B_{5d}</u>	4,6	0,60
<u>S₅</u>	20,0	1,90	<u>N_{IF}</u>	6,4	1,50	<u>N_{VIk3}</u>	3,4	0,10	<u>B_{2f}</u>	6,8	0,06	<u>B_{6a}</u>	8,3	0,60
<u>S₆</u>	24,1	1,60	<u>N_{IG}</u>	8,0	1,90	<u>N_{VIl}</u>	6,7	0,20	<u>B_{2g}</u>	4,5	0,04	<u>B_{6b}</u>	5,7	0,40
<u>S₇</u>	13,9	1,20	<u>N_{Ih1}</u>	3,1	0,80	<u>N_{VIm1}</u>	2,8	0,07	<u>B_{2h}</u>	2,6	0,03	<u>B_{6c}</u>	11,9	0,80
<u>S₈</u>	1,4	1,40	<u>N_{Ih2}</u>	1,0	0,30	<u>N_{VIm2}</u>	5,8	0,13	<u>B_{3a1}</u>	8,8	0,11	<u>B_{6d}</u>	48,3	3,50
			<u>N_{Ij}</u>	3,9	0,90	<u>N_{VIn1}</u>	3,1	0,15	<u>B_{3a2}</u>	33,7	0,44	<u>B_{6e}</u>	5,7	0,40
			<u>N_{IIIa}</u>	6,2	2,80	<u>N_{VIn2}</u>	3,5	0,17	<u>B_{3b1}</u>	5,9	0,11	<u>B_{6f}</u>	4,0	0,30
			<u>N_{IIIb}</u>	9,7	4,40	<u>N_{VIn3}</u>	7,8	0,38	<u>B_{3b2}</u>	8,6	0,15			
			<u>N_{IIIc}</u>	9,4	4,30	<u>N_{VIo}</u>	37,4	1,10	<u>B_{3c1}</u>	9,4	0,12			
			<u>N_{IIId}</u>	9,9	4,50	<u>N_{VIp1}</u>	0,9	0,03	<u>B_{3c2}</u>	26,9	0,33			
			<u>N_{IV1}</u>	12,9	2,20	<u>N_{VIp2}</u>	0,9	0,03	<u>B_{3d1}</u>	9,9	0,09			
			<u>N_{IV2}</u>	22,6	3,90	<u>N_{VIp3}</u>	3,7	0,10	<u>B_{3d2}</u>	3,7	0,03			
			<u>N_{IV3}</u>	13,9	2,40	<u>N_{VIp4}</u>	1,4	0,04	<u>B_{3e}</u>	6,1	0,02			
			<u>N_{IV4}</u>	18,0	3,00	<u>N_{VIr}</u>	10,0	0,30	<u>B_{3f1}</u>	2,1	0,01			
			<u>N_V</u>	448,0	12,50	<u>N_{VIs1}</u>	1,9	0,02	<u>B_{3f2}</u>	8,9	0,06			
			<u>N_{VIa1}</u>	2,4	0,03	<u>N_{VIs2}</u>	3,3	0,03	<u>B_{3f3}</u>	4,7	0,03			
			<u>N_{VIa2}</u>	4,9	0,07	<u>N_{VIs3}</u>	5,5	0,05	<u>B_{4a}</u>	975,4	3,20			
			<u>N_{VIb}</u>	7,3	0,20	<u>N_{VIt1}</u>	4,4	0,20	<u>B_{4b}</u>	169,8	0,60			
			<u>N_{VIc}</u>	9,2	0,30	<u>N_{VIt2}</u>	4,9	0,30	<u>B_{4c}</u>	337,9	1,10			
			<u>N_{VIId}</u>	13,6	0,40	<u>N_{VIn1}</u>	3,4	0,10	<u>B_{4d1}</u>	10,6	0,22			
			<u>N_{VIe1}</u>	2,0	0,04	<u>N_{VIn2}</u>	4,1	0,10	<u>B_{4d2}</u>	20,6	0,42			
			<u>N_{VIe2}</u>	1,1	0,02	<u>N_{VIv}</u>	8,1	0,20	<u>B_{4d3}</u>	12,7	0,26			
			<u>N_{VIe3}</u>	2,0	0,04	<u>N_{VIw}</u>	14,6	0,40	<u>B_{4e}</u>	183,4	0,60			
			<u>N_{VIIf}</u>	19,9	0,50	<u>N_{VIX1}</u>	2,3	0,05	<u>B_{4f}</u>	210,6	0,70			
			<u>N_{VIG1}</u>	13,3	0,60	<u>N_{VIX2}</u>	2,4	0,05	<u>B_{4g}</u>	254,2	0,80			
			<u>N_{VIG2}</u>	6,3	0,30				<u>B_{4h}</u>	22,3	0,10			
10	115,6	13,00	31	681,4	54,00	30	183,0	6,00	31	2681,3	12,00	12	150,3	15,00

S-Fraktion: 10 Peptide; 115,6 mg = 13 %

N-Fraktion: 61 Peptide; 864,4 mg = 60 %

B-Fraktion: 43 Peptide; 2831,6 mg = 27 %

Summe: 114 Peptide; 3811,6 mg = 100 %

unterstrichen) wurden nach dem Entsalzen in einer von K. HANNIG entwickelten Apparatur zur quantitativen Aminosäurebestimmung an Ionenaustauschersäulen mit anschließender automatischer Registrierung der Ergebnisse (35) - soweit es die Mengen zuließen, in Doppelbestimmungen - untersucht. Die Reproduzierbarkeit dieser Methode beträgt etwa $\pm 3\%$ vom gefundenen Wert. In Tabelle 11 sind die Aminosäureanalysen⁺ aller in einheitlicher Form gewonnenen Peptide eingetragen; der Übersicht wegen sind hier nur die abgerundeten stöchiometrischen Verhältnisse angegeben; im tabellarischen Anhang (S. 101) sind die Analysen dieser Peptide ausführlicher aufgeführt.

Die in Tabelle 11 eingetragenen Peptide sind nach ihrer Polarität geordnet; der Gehalt an polaren Aminosäuren (Summe aus Dicarbonsäuren und Diaminosäuren) nimmt von links nach rechts ab. Zwei Peptide (N_{VIr} , N_{VIw}) enthalten Glucosamin; diese Peptide fallen ferner auf durch ihren relativ geringen Gehalt an Iminosäuren und durch zahlreiche, ziemlich komplexe Monoaminosäuren (28 von 63 bei N_{VIw} und 21 von 63 bei N_{VIr} , ohne Glycin).

Die aus der Aminosäureanalyse sich ergebende Mindestkettenlänge für die isolierten Peptide liegt zwischen 3 und 131 Aminosäureresten.

b) Endgruppenbestimmungen und Sequenzermittlungen

Soweit die vorhandenen Substanzmengen es zuließen, wurden an den elektrophoretisch und chromatographisch einheitlichen Peptiden Endgruppenbestimmungen nach SANGER (S. 80) und AKABORI (S. 82) - zum Teil quantitativ - durchgeführt. In Tabelle 12 sind die Ergebnisse der Endgruppenbestimmungen zusammengestellt. Für diejenigen Peptide, an denen die Endgruppenermittlung quantitativ durchgeführt werden konnte, ist das aus dieser Bestimmung errechnete Molekulargewicht aufgeführt; zum Vergleich sind auch die sich aus den Aminosäureanalysen (Tab. 11) ergebenden Molekulargewichte in die Tabelle 12 eingetragen. Nur in zwei Fällen (S_{86} und S_5) stimmt die aus der Aminosäure-

⁺ Für die stets zuverlässig durchgeführten quantitativen Aminosäureanalysen sämtlicher von mir im Verlaufe dieser Arbeit gewonnenen Peptide möchte ich Fräulein R. Scharf (Abteilung Hannig) an dieser Stelle meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Tabelle 11. Aminosäurezusammensetzung der in einheitlicher Form gewonnenen Pro kollagenpeptide

Fraktion	B ₁	B _{6d}	S ₈₆	S ₇₈	B _{3d2}	S ₁	B _{3f3}	S ₂	B _{4d2}	N _{VIr}	N _{IV1}	S ₅	N _{VIe3}	N _{IV3}	B _{3c2}	N _{IV2}	N _{VI1}	N _{VI3}	N _{VI}
Gly	1	1	5	13	3	19	7	19	5	20	11	12	30	12	9	20	12	15	3
Ala	-	-	-	3	1	2	-	6	2	8	2	6	10	2	4	6	3	3	
Val	-	-	-	-	-	-	-	2	-	1	1	-	1	2	-	1	-	2	
Leu	-	-	-	-	6	-	-	3	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	
Ileu	-	-	-	-	3	-	7	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
Phe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ser	-	-	-	-	-	1	-	1	-	7	3	-	4	2	-	1	4	1	
Thr	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2	1	-	-	-	-	
Tyr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Met	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
Pro	-	-	-	3	-	7	-	4	2	3	1	7	5	5	5	10	2	4	1
Hyp	-	-	-	2	-	8	-	4	-	-	2	2	-	1	-	2	4	5	
Asp	-	-	2	6	-	15	-	9	-	3	2	3	9	2	-	3	3	6	
Glu	-	1	3	5	-	2	-	4	2	4	3	6	2	5	-	6	4	3	
Lys	-	-	-	2	-	-	1	2	-	2	2	-	2	1	-	4	2	-	
Hylys	-	-	1	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
His	1	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	
Arg	1	1	1	3	9	4	-	3	2	4	1	2	7	2	7	2	-	3	
Glucosamin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	
Kettenlänge	3	3	13	37	22	58	21	59	13	63	28	38	72	35	25	55	34	43	9
Mol% Glycin	33	33	38	35	14	33	33	32	38	32	39	32	42	34	36	36	35	35	3
Mol% Bas.As.	66	33	15	13	41	7	33	9	15	16	11	5	13	9	28	11	6	7	
Mol% Sre.As.	-	33	39	30	-	29	-	22	16	14	18	24	15	20	-	16	20	21	1
Mol% Pol.As.	66	66	54	43	41	36	33	31	31	30	29	29	28	29	28	27	26	28	2
Mol% ProHyp	-	-	-	14	-	26	-	14	15	5	11	24	7	17	20	22	18	21	2

POLAR ←

Fraktion	N _{VIr}	N _{VI1}	N _{IH1}	N _{VI2}	N _{VI3}	B _{5r}	N _{III1}	N _{VI2}	N _{IV4}	N _{VI1}	N _{II1}	N _{VI0}	N _{III1}	N _{IH2}	B _{6b}	N _{VI2}	N _{II2}	N _{IF}	N _{VI}
Gly	15	20	28	15	28	18	17	29	16	33	15	25	24	17	21	17	38	42	3
Ala	6	9	12	9	10	5	12	20	2	10	5	6	13	7	4	4	12	21	1
Val	3	-	1	1	2	1	1	-	1	2	1	3	-	1	1	2	5	3	
Leu	2	3	2	-	2	1	2	-	2	4	1	5	1	1	-	2	2	-	
Ileu	-	-	-	-	1	-	5	3	1	-	-	-	3	-	2	-	2	4	
Phe	1	-	1	1	2	-	3	-	3	2	1	-	3	-	1	-	1	-	
Ser	8	2	4	1	1	3	2	1	3	4	2	1	1	3	4	4	5	1	
Thr	6	-	1	-	2	1	2	-	-	-	1	6	2	1	2	2	1	2	
Tyr	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Met	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Pro	3	1	9	4	12	9	2	7	6	14	9	10	5	8	8	5	27	31	3
Hyp	4	10	11	3	8	4	11	8	7	12	5	11	9	4	6	7	9	11	10
Asp	3	3	4	2	3	2	3	8	1	3	1	1	4	2	1	-	4	6	
Glu	1	7	9	4	8	2	4	2	3	11	5	4	1	5	2	4	4	5	
Lys	4	-	1	1	3	2	1	1	4	2	1	3	1	-	1	-	2	1	
Hylys	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2	2	
His	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	
Arg	3	2	3	1	2	4	4	4	-	2	1	5	3	-	4	2	2	2	
Glucosamin	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Kettenlänge	63	58	86	42	85	52	69	83	50	99	48	80	72	49	57	49	116	131	10
Mol% Glycin	24	34	33	36	33	34	25	35	32	33	31	31	33	35	37	34	33	32	3
Mol% Bas.As.	11	4	5	5	6	11	8	6	10	4	4	10	8	-	9	4	5	4	
Mol% Sre.As.	10	17	15	14	13	8	10	12	8	14	13	6	7	14	5	8	7	8	
Mol% Pol.As.	21	21	20	19	19	19	18	18	18	18	17	16	15	14	14	12	12	12	
Mol% ProHyp	11	19	23	17	24	25	19	18	26	26	29	26	19	25	25	24	31	32	3

Im2	S4	N _{VIg1}	N _{VIv}	N _{VIh1}	N _{VIe2}	N _{VIk1}	N _{VIk2}
2	20	38	22	21	26	37	15
5	4	14	8	8	9	14	7
7	1	2	2	1	-	2	1
4	-	3	1	2	1	4	1
-	2	-	-	-	-	-	-
-	-	-	2	-	1	2	1
4	1	3	4	2	3	4	1
-	2	1	2	-	3	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
-	-	2	-	1	-	-	-
1	9	8	5	5	11	9	5
9	6	13	4	6	9	11	4
5	1	3	4	4	5	4	2
9	11	16	6	7	8	15	5
1	3	2	4	1	4	2	1
-	-	-	-	-	-	-	1
-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	5	1	2	2	3	1
-	-	-	-	-	-	-	-
0	60	110	65	60	82	107	45
5	33	34	34	35	32	35	33
3	5	7	8	5	7	4	7
7	20	17	15	18	16	18	15
5	25	24	23	23	23	22	22
2	25	19	14	18	24	19	20

→ APOLAR

C	N _{IG}	N _{IB1}	N _{VIc}	N _{IE}	N _{IA}	N _{IB2}	
-	39	18	23	32	8	27	
-	14	3	7	14	2	7	
-	2	1	5	3	1	-	
-	2	-	6	-	-	-	
-	2	-	1	1	-	3	
-	-	-	1	-	-	-	
-	4	5	7	-	1	8	
-	2	-	7	2	-	5	
-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	3	-	-	-	
-	27	22	6	25	8	22	
-	11	6	4	7	3	12	
-	4	1	2	3	1	-	
-	5	3	-	2	-	-	
-	1	3	3	3	1	4	
-	1	-	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	
-	2	-	2	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	
-	116	62	77	92	25	88	
-	34	29	30	35	32	31	
-	3	5	6	3	4	5	
-	8	6	3	6	4	-	
-	11	11	9	9	8	5	
-	33	45	13	35	44	39	

Tabelle 12

Endgruppen und Molekulargewichte einiger aus dem tryptischen Abbau von Prokollagen gewonnener Peptide

Fraktion	S ₈₆	S ₁	S ₄	S ₅	N _{IV1}	N _{IV2}	N _{IV3}	N _{IV4}	N _{VIc}
N-terminal	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
C-terminal	Arg	Arg	Lys	Arg	2Lys 1Arg	2Lys 1Arg	1Lys 2Arg	Lys	Arg
MG(Sanger)	1200	2300	-	3350	870	1700	1100	1200	2400
MG(Analyse)	1321	6528	5528	3468	2499	4915	3330	4630	6936

Fraktion	N _{VIc}	N _{VIg1}	N _{VIg2}	N _{VII1}	N _{VII}	N _{VIv}	N _{VIw}	B ₁	B _{5r}
N-terminal	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
C-terminal	2Lys 1Arg	Arg	Arg	Arg	1Lys 2Arg	2Lys 1Arg	Lys	Arg	2Lys 1Arg
MG(Sanger)	2300	3450	-	1600	3000	1700	-	-	1420
MG(Analyse)	7722	10035	4354	5234	9013	5840	5913	368	4670

reanalyse ermittelte Kettenlänge der Peptide mit der aus der quantitativen Endgruppenbestimmung abgeleiteten Kettenlänge überein. In fast allen anderen Fällen (S₁, N_{IV1}, N_{IV2}, N_{IV3}, N_{VIc}, N_{VIc}, N_{VIg1}, N_{VII1}, N_{VII}, N_{VIv}, B_{5r}) ist das aus der Aminosäureanalyse abgeleitete Mindestmolekulargewicht innerhalb der experimentellen Fehlergrenze recht genau dreimal so groß als dasjenige, welches sich aus

der aus der Endgruppenbestimmung abgeleiteten Kettenlänge ermitteln läßt, obwohl diese Fraktionen chromatographisch nicht mehr weiter getrennt werden konnten, vor allem aber ihre Aminosäureanalysen ganzzahlige stöchiometrische Verhältnisse ergaben. - Eine Ausnahme bildet die Fraktion N_{IV4}; hier beträgt das Verhältnis des aus der Bestimmung der Kettenlänge nach SANGER errechneten Molekulargewichtes zu dem Mindestmolekulargewicht (berechnet aus der Analyse) etwa 1 : 4.

Auf Grund dieses Befundes kann man annehmen, daß die isolierten Peptide noch durch intermolekulare Bindungen zu Dreierketten verknüpft sind.

Soweit die Ausbeuten der in Tabelle 11 aufgeführten Peptide ausreichen, wurden enzymatische Abbauversuche mit geeigneten Exopeptidasen unternommen. Dabei war es in den meisten Fällen schwierig, die Sequenz der Aminosäurereste eindeutig festzulegen, da oft mehrere Aminosäuren mit gleicher oder sehr ähnlicher Geschwindigkeit durch das eingesetzte Enzym abgespalten wurden. Dies wird verständlich, wenn die obige Annahme über das Vorhandensein von drei miteinander verbundenen Ketten richtig ist.

In Tabelle 13 sind die zehn auf ihre Sequenz näher untersuchten Peptide zusammengestellt; zur Aufstellung der Formeln wurden die Ergebnisse der Aminosäureanalysen, der Endgruppenbestimmungen und der enzymatischen Abbauversuche verwendet; während die ohne Klammern stehenden Aminosäurereste in ihrer Sequenz eindeutig festgelegt werden konnten, wurden die innerhalb der runden Klammern stehenden Aminosäurereste zwar durch enzymatischen Abbau identifiziert, jedoch konnte ihre Sequenz aus oben erwähnten Gründen nicht festgelegt werden; die in den eckigen Klammern stehenden Aminosäuren gehören dem nicht angegriffenen Restpeptid an.

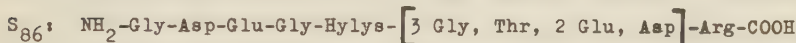
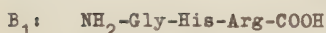
Fraktion B₁ ist auf Grund der Aminosäureanalyse ein Tripeptid aus den Aminosäuren Glycin, Histidin und Arginin. Da N-terminal Glycin, C-terminal Arginin ermittelt werden konnten, war die Sequenz Gly-His-Arg eindeutig festzulegen. - Dieses Peptid ist identisch mit der in Kapitel I isolierten Fraktion B₁ (S. 24).

Fraktion S₈₆ besteht aus 13 Aminosäureresten, von denen Arginin als

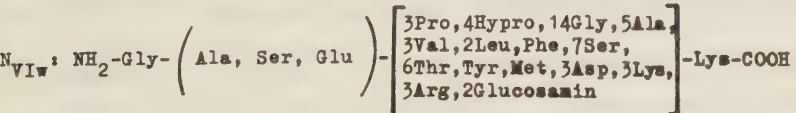
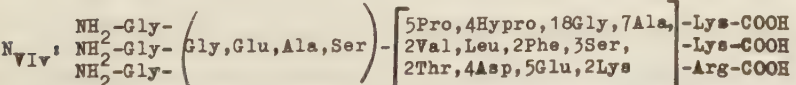
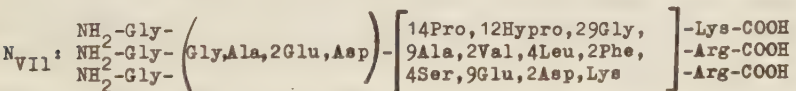
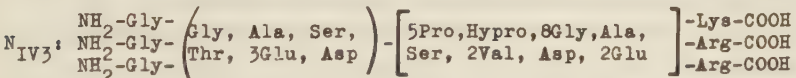
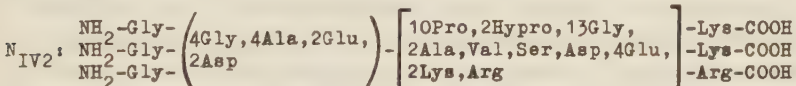
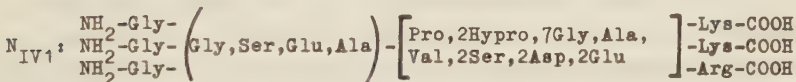
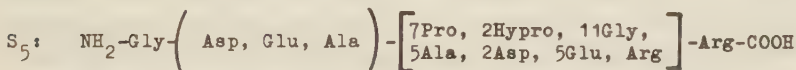
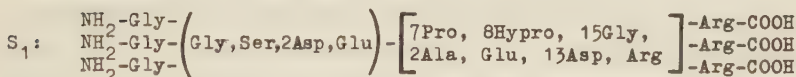
Tabelle 13

Konstitution von Abbaupeptiden des Prokollagens

1. Prolinfreie stark polare Peptide



2. Prolin- und hydroxyprolinhaltige Peptide



carboxylendständig (nach AKABORI, S. 82) und Glycin als aminoendständig (nach SANGER, S. 80) identifiziert werden konnten (Mindestmolekulargewicht = Kettenlänge); dieses Peptid besteht also nur aus einer Kette, was auch der Abbau mit Aminopolypeptidase bestätigt, bei dem nacheinander Glycin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin und Hydroxylysin auftreten. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß Fraktion S₈₆ identisch ist mit der in Kapitel I (S. 18) isolierten Fraktion S_a (vgl. auch S. 87).

Weder B₁ noch S₈₆ enthalten Prolin oder Hydroxyprolin, dagegen einen ziemlich hohen Gehalt an Dicarbon- und Diaminosäuren (B₁: 66 Mol %, S₈₆: 54 Mol %); die beiden Fraktionen zählen also zu den ausgesprochen polaren Peptiden.

Fraktion S₁ besteht auf Grund der Endgruppenbestimmungen nach AKABORI und SANGER aus drei Ketten. Nach der Abspaltung des carboxylendständigen Arginins mittels Carboxypeptidase B (S. 88) konnte durch Carboxypeptidase A noch etwas Alanin nachgewiesen werden. Beim enzymatischen Abbau mit Aminopolypeptidase traten vier Glycin, zwei Asparaginsäuren sowie ein Serin und eine Glutaminsäure auf. Das nicht aufgeklärte Mittelstück enthielt abgesehen von zwei Alanin 15 Glycin, 15 Prolin + Hydroxyprolin und 15 polare Aminosäuren. Wenn das Mittelstück aus drei Ketten besteht, so würden auf jede fünf Prolin + Hydroxyprolin entfallen. In bezug auf die polaren Aminosäuren, deren hoher Gehalt bei diesem Peptid auffällt (21!), würden sich die drei Ketten darin unterscheiden, daß in einer von ihnen - abgesehen von den basischen Endgruppen - eine saure Aminosäure durch die Base Arginin ersetzt ist.

Fraktion S₅ besteht, wie die Endgruppenbestimmungen zeigten, aus einer Kette; mit Aminopolypeptidase konnten außer Glycin noch je eine Asparaginsäure und Glutaminsäure sowie ein Alanin abgespalten werden.

Fraktion N_{IV1} gehört ebenfalls noch zu den ziemlich stark polaren Peptiden (29 Mol % Diamino- und Dicarbonsäuren); die Endgruppenbestimmung nach AKABORI ergab die Aminosäuren Arginin und Lysin im Verhältnis 1 : 2; da nach SANGER etwa drei Mol Glycin als aminoendständig festgestellt werden konnten, besteht das Peptid noch aus drei Ketten; mit Aminopolypeptidase wurden vier Glycin und je ein Mol

Serin, Glutaminsäure und Alanin abgespalten. Das nicht aufgeklärte Mittelstück enthält nur ein Prolin und zwei Hydroxyprolin, jedoch gar keine Basen.

Fraktion N_{IV2} besteht ebenfalls aus drei Ketten; C-terminal wurden Arginin und Lysin im Verhältnis 1 : 2 gefunden. Der Abbau mit Aminopolypeptidase ergab sieben Glycin-, vier Alanin-, zwei Glutaminsäure- und zwei Asparaginsäurereste. Die Zahl der Iminosäuren (12) ist auch hier durch drei teilbar; offenbar enthält jede Kette vier von ihnen.

Fraktion N_{IV3} zeigte C-terminal die Aminosäuren Arginin und Lysin im Verhältnis 2 : 1 und N-terminal drei Mol Glycin. Durch Aminopolypeptidase konnten vier Glycin- und drei Glutaminsäurereste, eine Asparaginsäure und je ein Alanin, Serin und Threonin abgespalten werden. Im unaufgeklärten Mittelstück fanden sich u. a. sechs Iminosäuren (= zwei pro Kette).

Fraktion N_{VI1} enthält C-terminal die Aminosäuren Arginin und Lysin im Verhältnis 2 : 1; die Aminoendgruppenbestimmung nach SANGER ergab drei Glycinreste, so daß auch dieses Peptid als Dreierkette vorliegt. Der enzymatische Abbau vom Aminoende her ergab die Aminosäuren Glycin (4), Glutaminsäure (2), Alanin (1) und Asparaginsäure (1). Im nicht erfaßten Restpeptid stehen 26 Iminosäuren.

Fraktion N_{VIv} besteht auf Grund der Endgruppenbestimmungen (C-terminal: Arginin und Lysin (1 : 2), N-terminal: 3 Glycin) aus drei Ketten; mit Aminopolypeptidase ließen sich vier Glycin, eine Glutaminsäure und je ein Alanin und Serin abspalten. Von den neun vorhandenen Iminosäuren würden auf jede Kette drei entfallen.

Fraktion N_{VIw} zeigte endständig nur je ein Lysin und Glycin; am Aminoende folgten beim enzymatischen Abbau dem Glycin die Aminosäuren Serin, Glutaminsäure und Alanin. Die Zahl der Iminosäuren beträgt hier sieben.

Die Sequenzuntersuchung in den mittelständigen Restpeptiden bereitet mit den bisher möglichen Methoden große Schwierigkeiten. Sie ist jedoch denkbar durch eine Spaltung mit Kollagenase; die erhaltenen kleineren Bruchstücke könnten dann mit Prolinase und Prolidase weiter aufgespalten werden.

4. Diskussion der Ergebnisse

Die Aufgabe, die Aminosäuresequenz des Kollagens zu ermitteln und mit dem elektronenmikroskopischen Bild in Beziehung zu setzen, war schwierig geworden, nachdem feststand, daß die sich wiederholende Einheit nicht 650 Å, sondern etwa 2600 Å lang ist und daß sie nicht aus einer, sondern aus drei wahrscheinlich untereinander verschiedenen Ketten (28) besteht. Tatsächlich findet man für das etwa 2600 Å lange und 15 Å dicke lösliche Monomere des Kollagens, das Tropokollagen, ein Molekulargewicht von 360000, was etwa 3000 Aminosäuren entspricht (17).

Um wenigstens eine Teillösung dieser Aufgabe zu erreichen, ist das durch mehrmalige Rekristallisation gereinigte säurelösliche Kollagen ("Prokollagen") in der vorliegenden Arbeit mit Trypsin abgebaut und der Versuch unternommen worden, die dabei entstandenen Peptide voneinander zu trennen und in ihrer Zusammensetzung und möglichst auch in ihrer Sequenz aufzuklären. Für die Spaltung mußte zur Erzielung eindeutiger Ergebnisse ein völlig von Chymotrypsin befreites Trypsin verwendet werden, das nach einem in dieser Arbeit ausgearbeiteten elektrophoretischen Verfahren gewonnen wurde.

Da der Abbau gemäß den titrimetrischen Ergebnissen zu Peptiden von der mittleren Kettenlänge von etwa 18 Aminosäuren führte, waren etwa 160 Abbaupeptide (vgl. S. 14) zu erwarten, die zu trennen und in einheitlicher Form zu isolieren als eine äußerst schwierige Aufgabe gelten mußte. Sie konnte durch Kombination von kontinuierlicher Elektrophorese nach GRASSMANN und HANNIG, säulenchromatographischer Trennung an Dowex 1 x 2 (82) und präparativer Papierchromatographie im wesentlichen gelöst werden. Obwohl der Versuch von 62 g Prokollagen startete, waren jedoch die Endausbeuten an einheitlichen Peptiden wegen der zahlreichen Trenn- und Reinigungsschritte natürlich sehr gering (5 bis 100 mg, meist etwa 10 mg an annähernd einheitlichen Peptiden und 1 bis 37 mg, meist etwa 5 mg an analytisch einheitlichen Peptiden). Da die bei jedem einzelnen Reinigungsschritt resultierenden bzw. durch Verwerfen von Zwischenfraktionen in Kauf genommenen Verluste (zu denen noch zahllose Probenahmen für analytische Zwecke hinzukommen) im

allgemeinen, namentlich in den letzten Reinigungsschritten mit einer gewissen Genauigkeit abgeschätzt werden können, kann für jedes der in reiner Form isolierten Peptide wenigstens größenordnungsmäßig geschätzt werden, in welcher Menge es in dem ursprünglichen Abbaugemisch anwesend sein konnte (in den Tabellen als "geschätzte Menge Gew. %", in Tab. 10 als % angegeben).

Von den insgesamt 114 isolierten Fraktionen konnten 55 Peptide als elektrophoretisch und chromatographisch einheitlich bezeichnet werden (Tab. 10); 51 Peptide wurden säulenchromatographisch auf ihre quantitative Aminosäurezusammensetzung untersucht (Tab. 11); an 18 Peptiden konnten Endgruppenbestimmungen - zum Teil quantitativ - durchgeführt werden (Tab. 12), während für 10 Peptide die vorhandenen Substanzmengen enzymatische Abbauprobungen mit geeigneten Exopeptidasen zuließen (Tab. 13). - Die bei diesem Abbau gewonnenen Peptide S₈₆, B₁ und B_{6d} entsprechen auf Grund ihrer Aminosäurezusammensetzung den von GRASSMANN und Mitarbeitern bereits 1956 isolierten Peptiden S_a (vgl. auch S. 18), B₁ (vgl. auch S. 26) und B_{6a} (29).

Auf Grund der "geschätzten Mengen" dürften in sämtlichen analysierten Peptiden etwa 50 % des Gesamtkollagens erfaßt sein, während die wirklich gewonnenen Mengen natürlich wesentlich kleiner waren.

Die auf Grund der Aminosäureanalysen und der geschätzten Mengen erfaßten Ausbeuten an den einzelnen Aminosäuren betragen im allgemeinen für jede einzelne ebenfalls etwa 50 %; starke Abweichungen zeigen lediglich die Aminosäuren Methionin und Tyrosin, von denen nur etwa 12 % bzw. 1,5 % wiedergefunden wurden, d. h., unter den noch nicht in einheitlicher Form gewonnenen Peptiden muß noch wesentlich mehr Methionin und Tyrosin enthalten sein als in den bereits in einheitlicher Form gewonnenen.

Dies ist aus zwei Gründen bedauerlich: Auf der einen Seite sind gerade Aminosäuren, die innerhalb einer Eiweißkette nur einmal oder nur selten vorkommen, für die Sequenzfestlegung in den entsprechenden Teilen der Kette besonders wichtig, wie u. a. die Arbeiten von Sanger am Insulin zeigten; zum anderen neigt F. O. SCHMITT dazu, tyrosinhaltigen "Schwänzen" des Tropokollagenmoleküls eine besondere Bedeutung für die Längsverknüpfung zur Fibrille zuzuschreiben. (26). Auch war das erste langkettige Peptid mit prolin- und hydroxyprolinhaltigem "Mittelstück", das GRASSMANN und Mitarbeiter 1956 isoliert haben - das Peptid ist in meiner Arbeit beim Abbau mit dem früher verwendeten chymotrypsinhaltigen Trypsin wieder isoliert worden, aber beim Versuch mit einheitlichem Trypsin erwartungsgemäß nicht mehr aufzutreten (vgl. S. 25) - gleichfalls tyrosinhaltig.

Obwohl also eine Totalerfassung sämtlicher tryptischer Abbaupeptide bzw. aller Aminosäuren des Kollagens nicht gelang und nach Lage der Dinge auch nicht gelingen konnte, sind die vorliegenden Ergebnisse immerhin ausreichend, um eine Reihe recht grundsätzlicher Einblicke in die chemische Struktur des Kollagens zu ermöglichen.

Aus den Aminosäureanalysen ist ersichtlich (Tab. 11), daß alle untersuchten Abbaupeptide bis auf drei mengenmäßig nicht ins Gewicht fallende Ausnahmen (N_{IIIId} , N_{VIW} , B_{3d2}) je ein Drittel ihrer Aminosäuren in Form von Glycin enthalten, was für eine recht gleichmäßige Verteilung des Glycins über das ganze Kollagenmolekül spricht. Die naheliegende Vorstellung, daß Glycin regelmäßig an jeder dritten Stelle der Kette wiederkehre, läßt sich trotzdem - mindestens für die ungeordneten Bereiche - nicht aufrechterhalten. Dem widerspricht schon die Isolierung von Peptiden, in denen zwei Glycinreste unmittelbar miteinander verknüpft oder nur durch eine Aminosäure getrennt vorliegen, wie durch SCHROEDER (79), aber auch durch die Sequenzanalyse z. B. des Peptids S_C (S. 21) gezeigt werden konnte; andererseits wurden aber auch Peptide gefunden, in denen wenigstens vier Sequenzen (S_5 , N_{VIW}) oder sogar wenigstens fünf Sequenzen (S_F) ohne Glycin auftraten.

Ordnet man die auf ihre Aminosäurezusammensetzung untersuchten Peptide nach ihrem Gehalt an stark polaren Aminosäuren (Summe aus Dicarbon- und Diaminosäuren) an, wie es in Tabelle 11 geschehen ist, so kann man eine gewisse Gegenläufigkeit des Gehaltes an Iminosäuren (Prolin + Hydroxyprolin) zu dem der polaren Aminosäuren feststellen. Damit bestätigt sich das Vorliegen apolarer Bereiche ("interbands"), die reich an Prolin und Hydroxyprolin sind (z. B. Peptid N_{IA} : 2 polare Aminosäuren, 11 Iminosäuren), während andere Bereiche arm an Iminosäuren, jedoch reich an Diamino- und Dicarbonsäuren sind ("bands") (z. B. Peptid S_{86} : 7 polare Aminosäuren, keine Iminosäuren); das Vorliegen solcher Bereiche war bereits 1951 von GRASSMANN und TRUPKE (9) sowie von BEAR (1952 (10)) auf Grund elektronenmikroskopischer und röntgenoptischer Untersuchungen vermutet worden.

Auch ist aus der Zusammenstellung der Aminosäureanalysen schon ersichtlich, daß es innerhalb der polaren Bereiche ausgesprochen ba-

sische und ausgesprochen saure Bereiche geben muß; in die basischen Bereiche wären z. B. die Peptide B_1 (2 Diaminosäuren, keine Dicarbonsäure), B_{3d2} (9 Diaminosäuren, keine Dicarbonsäure) und B_{3f3} (7 Diaminosäuren, keine Dicarbonsäure) einzuordnen. Vorwiegend sauren Charakter haben dagegen z. B. die Peptide S_1 (17 Dicarbonsäuren, 4 Diaminosäuren) und N_{IH2} (7 Dicarbonsäuren, keine Diaminosäure).

Aber auch innerhalb der einzelnen Peptide lassen sich auf Grund der enzymatischen Abbauversuche (Tab. 13) bereits Bereiche mit vorwiegend apolarem, polarem, saurem oder basischem Charakter erkennen. So befinden sich z. B. im enzymatisch nicht erfaßten Mittelstück der Fraktion N_{IV3} sechs Prolin + Hydroxyprolin, die zusammen mit zwölf weiteren neutralen, kurzkettigen Aminosäuren (Glycin, Alanin, Serin, Valin) einem apolaren Bereich angehören könnten, während sich unter den ersten neun Aminosäuren vom Aminoende her vier Dicarbonsäuren befinden, so daß dieser Bereich des Peptides ausgesprochen sauren Charakter besitzt. Auch bei der Fraktion N_{VII} besitzt das Aminoende stark sauren Charakter (von sechs Aminosäuren sind drei Dicarbonsäuren), während im unaufgeklärten Mittelstück 26 Prolin + Hydroxyprolin stehen. - Im unaufgeklärten Teil der Fraktion N_{VIW} stehen sechs basischen Aminosäuren nur drei saure Aminosäuren gegenüber, so daß hier ein basischer Bereich vermutet werden könnte.

Darüberhinaus konnte in anderen Arbeiten an unserem Institut der Nachweis von apolaren Bereichen innerhalb der Kollagenfaser, in denen Glycin, Prolin und Hydroxyprolin angereichert sind, durch nacheinanderfolgende Einwirkung von Trypsin, Chymotrypsin, Carboxypeptidase A und B und Aminopolypeptidase geführt werden (88). Durch einen solchen enzymatischen schrittweisen Abbau kann man die prolinfreien Bereiche weitgehend zerstören und Peptidgemische von einer mittleren Kettenlänge von sechs Aminosäuren erhalten, die etwa 30 Mol % Prolin + Hydroxyprolin und 33 Mol % Glycin enthalten.

Die Endgruppenbestimmungen an den einheitlichen Peptiden (Tab. 12) ergaben für das Aminoende ohne Ausnahme Glycin, während C-terminal ausschließlich Arginin und Lysin gefunden wurden; Hydroxylysin wurde bis jetzt in keinem Falle am Carboxylende angetroffen. Es sind also beim tryptischen Abbau von Kollagen nur Bindungen zwischen der Carboxylgruppe dieser beiden Basen und der Aminogruppe des Glycins gespalten worden.

Diese für Trypsin spaltbaren Bindungen entsprechen aber nur etwa 60 % des vorhandenen Arginins und Lysins. Die übrigen Bindungen,

an denen die beiden basischen Aminosäuren mit ihren Carboxylgruppen beteiligt sind, sind vollkommen trypsinresistent, und zwar auch bei wiederholter Einwirkung des Enzyms. In den isolierten Peptiden findet man den entsprechenden Anteil der beiden Basen mittelständig in einer Verknüpfungsart, die von Trypsin nicht angegriffen wird. Wahrscheinlich liegt hier eine Bindung an den Iminostickstoff des Prolins und Hydroxyprolins vor, denn Peptidbindungen dieses Typs erwiesen sich, wie L. GRIMM (90) durch Spaltversuche an geeigneten synthetischen Substraten nachweisen konnte, als trypsinresistent. Die Mengen an Prolin und Hydroxyprolin sind in jedem Falle ausreichend, um diese Hypothese zu stützen; ist sie richtig, so wären Lysin und Arginin mit ihren Carboxylendgruppen nur entweder an Glycin oder an Prolin bzw. Hydroxyprolin gebunden, was für eine gewisse Regelmäßigkeit im Molekülbau sprechen würde.

Überraschend waren die Ergebnisse der quantitativen Endgruppenbestimmung (Tab. 12). Bezogen auf das aus der quantitativen Aminosäureanalyse abgeleitete Mindestmolekulargewicht weisen sehr viele Peptide drei Aminoendgruppen - immer Glycin - und drei Carboxylendgruppen - häufig Arginin und Lysin im Verhältnis 2 : 1 oder umgekehrt - auf. Z. B. ergibt sich für das Peptid N_{VII} aus der Aminosäureanalyse ein Mindestmolekulargewicht von 9013, während die Aminoendgruppenbestimmung nach Sanger unter Zugrundelegung dieses Molekulargewichtes drei (genau: 2,98) aminoendständige Glycin ergibt. Die C-terminale Aminosäurebestimmung nach Akabori ergab für dieses Peptid pro angenommenes Mindestmolekulargewicht 2 Arginin und 1 Lysin. Auf Grund dieses Befundes kann man annehmen, daß die Fraktion N_{VII} aus drei Ketten besteht, die durch intermolekulare Bindungen miteinander verknüpft sind. Ähnliche Ergebnisse erhielt ich bei den Peptiden S_1 , N_{IV1} , N_{IV2} , N_{IV3} , N_{VIc} , N_{VIf} , N_{VIg1} , N_{VII1} , N_{VIv} und B_{5r} . Lediglich das mengenmäßig zurücktretende Peptid N_{IV4} (3,0 %) weicht von dieser Regel ab. Hier ist das Verhältnis zwischen dem aus der Aminosäureanalyse ermittelten Mindestmolekulargewicht und der aus der Endgruppenbestimmung abgeleiteten Kettenlänge größer als drei. Hier müßte also ein Assoziat aus mehr als drei Ketten vorliegen. Die Annahme von Dreierketten in den Abbaupeptiden wird weiter durch folgende Befunde gestützt;

1. Der Verlauf der tryptischen Spaltung des Prokollagens auf Grund

der quantitativen Bestimmung der freigesetzten Bindungen (Titrationskurven S. 14 u. 39) läßt unter Zugrundelegung eines Molekulargewichtes von 360000 für das Kollagen Peptide mit einer durchschnittlichen Kettenlänge von etwa 18 Aminosäuren erwarten. Das auf Grund der Aminosäureanalyse tatsächlich gefundene durchschnittliche Mindestmolekulargewicht aller analysierten Peptide betrug dagegen etwa 60 Aminosäuren (vgl. Tab. 11); dies ist etwa das Dreifache des erwarteten Wertes.

2. Beim enzymatischen Abbau derjenigen isolierten Peptide, die vermutlich aus drei Ketten aufgebaut sind, mit Aminopolypeptidase werden mehrere Aminosäuren mit gleicher oder mit ähnlicher Geschwindigkeit abgespalten. Bei Peptiden aus einer Kette wäre dies nur ausnahmsweise zu erwarten.

3. Bei den meisten enzymatisch untersuchten Peptiden (Tab. 13) ist in denjenigen, für die eine Dreierkette angenommen wird, die Summe von Prolin + Hydroxyprolin durch 3 teilbar, d. h., die Zahl der Iminosäuren läßt sich ohne weiteres auf die drei Ketten verteilen. So beträgt die Summe von Prolin und Hydroxyprolin im Peptid S_1 15 (= 5 Iminosäurereste pro Kette), in N_{IV1} 3 (= 1 Iminosäurerest pro Kette) usw. Ausnahmen bilden die Peptide N_{VIW} (7 Prolin + Hydroxyprolin) und N_{VII} (26 Prolin + Hydroxyprolin). Auch für die nicht näher in ihrer Sequenz untersuchten Peptide N_{VIg1} , N_{VIg2} , N_{VIv} (Tab. 12) gilt diese Dreiteilung.

Gegen die Annahme, daß in den isolierten Abbaupeptiden die ursprünglichen Dreierspiralen des Kollagens noch erhalten seien, wie sie das von RICH und CRICK (18) auf Grund der Röntgenstrukturbefunde aufgestellte Modell verlangt, kann eingewandt werden, daß nach den Vorstellungen amerikanischer Autoren (17,28) schon bei der Hitzedenaturierung des Prokollagens, die notwendig ist, um das Kollagen dem enzymatischen Abbau zugänglich zu machen, eine "Entfaltung" der Kollagenmoleküle, also eine Trennung der Dreierpeptidketten eintritt. Diese Annahme wird im wesentlichen auf physikalische Messungen gestützt, insbesondere auf die starke Verminderung der optischen Drehung, die bei der Hitzedenaturierung beobachtet wird (28). Ob dies richtig ist und ob die angenommene "Entfaltung" auch wirklich unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen (Denaturierung

in fester Form oder in Lösung, Vernetzung des Kollagenmaterials usw.) eintritt, bleibt zunächst weiter zu untersuchen. Sollte sich die Auffassung der amerikanischen Autoren bestätigen, dann müßten die isolierten Dreikettenpeptide sich sekundär aus zunächst einkettigen Peptiden gebildet haben. Meine Ergebnisse wären dann ein Beleg für die derartigen prolin- und hydroxyprolinhaltigen Peptiden innewohnende Tendenz zur Anordnung zu Dreikettensystemen.

Für die Möglichkeit einer Wiedierzusammenlagerung nach der Denaturierung sprechen inzwischen veröffentlichte Untersuchungen von VEIS und COHEN (91), die aus hitzedenaturierten Tropokollagenlösungen nach Abkühlung Kollagenfasern erhielten mit einer Mehrkettenstruktur, die aber trotz der dem nativen Kollagen ähnlichen, im Elektronenmikroskop sichtbaren Identitätsperiode von $610 \text{ \AA}$ auf Grund des Fehlens der Helixstruktur nicht mit dem ursprünglichen Kollagen identisch sein sollen.

Die Ermittlung der Aminosäuresequenz innerhalb der "Interband-Bereiche" war nicht Gegenstand dieser Arbeit. Sie kann wegen der Unangreifbarkeit dieser Bereiche für die normalen eiweiß- und peptidspaltenden Enzyme nur entweder durch rein chemischen Abbau oder mittels Kollagenase erfolgen. Beim Abbau sowohl des Kollagens wie der angereicherten Interband-Fractionen durch Kollagenase geht der Zuwachs an Amino- und Carboxylgruppen streng parallel, wobei eine Reihe der verschiedensten Aminosäuren C-terminal, N-terminal dagegen praktisch nur Glycin auftreten (GRASSMANN u. Mitarb. (89)). Es werden also keine Bindungen gespalten, an denen der Iminostickstoff von Prolin oder Hydroxyprolin beteiligt ist. Die nach dem Glycin nächstfolgende Aminosäure ist dann nach dem Ergebnis des Edmann-Abbaus ausschließlich Prolin. Damit ist die Sequenz

$X^+ \text{-gly-pro-}$

($^+$ bezeichnet die für Kollagenase spaltbare Bindung) für die Interband-Bereiche auch chemisch bewiesen (89).

Die auf Grund einer solchen Sequenz unter der Annahme einer Dreikettenanordnung und unter Zugrundelegung des Modells von RICH und CRICK errechneten Längen der "Interband-Bereiche" stehen in vernünftiger Beziehung zum elektronenmikroskopischen Bild. Es errechnet sich z. B. für die Peptide N_{IV1} eine "Interband-Länge" von $17 \text{ \AA}$, N_{IV2} von $34 \text{ \AA}$ und für S_1 von $45 \text{ \AA}$. Im elektronenmikroskopischen Bild der Long-spacing-Segmente findet man Hellstreifen von $15 - 45 \text{ \AA}$, so daß die Unterbringung der gefundenen apolaren Mittelbereiche keine Schwierigkeiten bereitet.

Ähnliche Überlegungen können für die polaren Bereiche angestellt

werden. In diesem Fall wird eine Zuordnung noch dadurch erleichtert, daß man, wie dies KÜHN, HOFMANN und GRASSMANN in ihren letzten Arbeiten gezeigt haben, Bereiche mit einer Anhäufung basischer oder saurer Aminosäuren durch besondere Anfärbetechnik elektronenmikroskopisch festlegen kann.

Für zukünftige Arbeiten mit dem Ziel der Sequenzermittlung an Kollagenmaterialien erscheint es nach den Erfahrungen der vorliegenden Arbeit zweckmäßig, das Molekül zunächst in wenige große Bruchstücke aufzuspalten und an diesen getrennt tryptische Abbauprobe durchzuführen. Dieser Weg müßte die schwierige Auftrennung der Abbaupptide erleichtern und ihre Isolierung in größeren Ausbeuten ermöglichen. Am erfolgversprechendsten erscheint der Weg, die nach milder Hitzedenaturierung von Kollagenlösungen entstehenden Komponenten mit der Bezeichnung α - und β -Kette (28) zu isolieren und Sequenzuntersuchungen an diesen Komponenten durchzuführen. Da z. B. die α -Komponente nur aus einer Kette bestehen soll (28), dürften in diesem Falle nach dem tryptischen Abbau nur Bruchstücke mit je einer Amino- und einer Carboxylendgruppe erhalten werden.

C. Methodische Einzelheiten

I. Darstellung und Reinigung von Abbaupeptiden des Prokollagens

1. Darstellung von Prokollagen

Die Herstellung von Prokollagen erfolgte aus Häuten von wenige Tage alten Kälbern nach einer etwas abgewandelten Vorschrift von OREKHO-VITSCH und Mitarbeitern (34).

Zunächst befreit man die Häute mit dem Scherdeggen von der Haarschicht, Papillarschicht und dem subcutanen Gewebe; größere Gefäße und Blutspuren werden mit dem Skalpell entfernt; alle Haarreste müssen schließlich sehr säuberlich weggeschnitten werden. Das so erhaltene Corium schneidet man in Stücke von ca. 2 x 2 cm und friert es in der Tiefkühltruhe (-25°C) etwa zwei Tage fest ein⁺. Anschließend wird der steife Kuchen mit dem Meißel auseinandergeschlagen und durch einen Fleischwolf gedreht. Um eine ausreichende Kühlung zu gewährleisten, gibt man hin und wieder Eiswürfel zu.

Der so erhaltene Hautbrei wird mit einem Phosphatpuffer vom pH 7 extrahiert, den man ein- oder zweimal erneuert; diese Extraktion dient der Herauslösung von löslichen Bindegewebeseiweißen.

Der Phosphatpuffer vom pH 7 wird aus 38,8 Teilen einer Lösung von 2,043 g KH_2PO_4 pro Liter Wasser und 61,2 Teilen einer Lösung von 2,672 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ pro Liter Wasser hergestellt. Pro Liter Puffer setzt man etwa 2 g Thymol hinzu. - Für 2000 g Corium benötigt man ca. 10 l Phosphatpuffer.

Nach der Extraktion wird vom Unlöslichen abzentrifugiert. Den erhaltenen Hautbrei gibt man portionsweise mit jeweils ungefähr dem fünffachen Volumen Citratpuffer vom pH 3,5 in einen Starmix, wobei dieses Mengenverhältnis möglichst streng einzuhalten ist.

Den Citratpuffer bereitet man aus 105 g Citronensäuremonohydrat, 500 ml n HCl und 1000 ml n NaOH durch Auffüllen mit destilliertem Wasser auf 10 l.

⁺ Für die freundliche Hilfe bei diesen technischen Vorarbeiten bin ich unserem Gerbermeister, Herrn von der Crone, zu Dank verpflichtet.

Das im Starmix erhaltene Homogenisat stellt man unter Toluolzusatz zwei Tage in den Kühlraum (ca. $+4^{\circ}\text{C}$) zur Extraktion. Anschließend wird wiederum abzentrifugiert. Die hierbei gewonnene klare Eiweißlösung wird in Cellophan-Dialysierschläuche von möglichst kleinem Durchmesser (z. B. 18 mm) gefüllt und im Kühlraum ($+4^{\circ}\text{C}$) gegen häufig erneuertes, mit Ammoniumhydrogencarbonat auf pH 7,5 gebrachtes Wasser dialysiert.

Der beim letzten Zentrifugieren verbliebene Rückstand wird nochmals portionsweise mit dem fünffachen Volumen Citratpuffer vom pH 3,5 in den Starmix gegeben und das hierbei erhaltene Homogenisat nach Toluolzusatz zwei Tage im Kühlraum extrahiert und anschließend abzentrifugiert; die erhaltene klare Eiweißlösung füllt man ebenfalls in Dialysierschläuche. Der bei diesem Abzentrifugieren verbliebene Rückstand kann verworfen werden, da seine nochmalige Extraktion keine wesentliche Ausbeuteverbesserung mehr bringt.

In den Dialysierschläuchen fällt das Prokollagen nach zwei bis drei Tagen vollständig aus. Der flockig aussehende weiße Niederschlag wird abzentrifugiert, noch feucht unter Toluolzusatz in einer seinem Volumen entsprechenden Menge des oben angegebenen Citratpuffers aufgelöst und wieder gegen schwach alkalisches Wasser dialysiert.

- Um sehr reine Präparate zu gewinnen, wiederholt man diesen Vorgang noch zwei- oder dreimal.

Das in den Dialysierschläuchen ausgefallene Prokollagen wird schließlich von neuem abzentrifugiert und anschließend im Starmix zwei- bis dreimal mit Wasser aufgeschlämmt, um die Puffersalze zu entfernen. Das hiernach abzentrifugierte Prokollagen wird in dünner Schicht auf großen Uhrgläsern ausgebreitet und gefriergetrocknet.

Aus etwa 3000 g Corium kann man nach diesem Verfahren 70 - 80 g Prokollagen erhalten. Die Bestimmung des Gesamtstickstoffs nach Kjeldahl ergab für das so hergestellte Prokollagen einen Wert von 17,13 %; der Aschegehalt betrug 0,25 %, der Kohlenhydratgehalt 0,6 %. Die quantitative Aminosäureanalyse ergab für unser Prokollagen die in der zweiten Spalte der Tabelle 1 (S. 15) aufgeführten Werte; zum Vergleich sind in Spalte III dieser Tabelle die von BOWES und Mitarbeitern (36) ermittelten Werte eingesetzt. Es kann eine recht gute Übereinstimmung der Werte festgestellt werden.

2. Tryptischer Abbau des Prokollagens

Da Trypsin das Prokollagen in nativem Zustand so gut wie gar nicht abbaut (92), wird letzteres zunächst denaturiert, indem man 1050 mg des Proteins in 25 ml Wasser, das man mit 0,2 n NaOH auf pH 8,2 eingestellt hat, aufschlämmt und 20 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Anschließend kühlt man die Prokollagen-Aufschlämmung auf 37° C ab, stellt den pH-Wert auf 8,2 nach, fügt 7 mg Trypsin zu und bringt das Gemisch in einen Thermostaten von 37° C. Während der ersten zwei Stunden stellt man nach jeweils 30 min den pH-Wert mit 0,1 n NaOH auf 8,2 nach. Zwei Stunden nach der ersten Zugabe von Trypsin gibt man nochmals 3 mg Enzym zu und kontrolliert innerhalb der nächsten zwei Stunden noch zweimal den pH-Wert.

Der tryptische Abbau des Prokollagens wurde titrimetrisch nach Waldschmidt-Leitz verfolgt. Die Ergebnisse dieser Titration sind in Abb. 2 (S. 14), Abb. 4 (S. 27) und Abb. 10 (S. 39) graphisch dargestellt.

Aus der oben beschriebenen Lösung von Prokollagen und Trypsin in Wasser vom pH 8,2 entnimmt man 2 ml (entsprechend 84 mg Prokollagen), gibt sie in ein Erlenmeyerkölbchen und versetzt mit 1 Tropfen 1%iger alkoholischer Thymolphthaleinlösung; anschließend titriert man mit $\frac{n}{50}$ alkohol. KOH bis zum Farbumschlag nach blau. Nun bringt man die Lösung in ein Wasserbad von 100° C und fügt nach dem Temperaturausgleich 9 ml vorgewärmten absoluten Alkohol (Äthanol) zu; die Blaufärbung verschwindet. Mit $\frac{n}{50}$ alkohol. KOH wird erneut bis zur deutlichen Blaufärbung titriert. Nach weiterer Zugabe von 9 ml heißem Alkohol beträgt nun das Gesamtvolumen der Lösung 20 ml + zugefügte Menge alkohol. KOH. Anschließend wird mit alkohol. KOH bis eben zum Umschlag nach blau auf gleichen Farbwert mit einem Standard titriert.

Eine Blindprobe - Prokollagensuspension ohne Trypsinzusatz - wird unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben titriert. Der sich ergebende Blindwert wird von den oben erhaltenen Titrationswerten abgezogen; die dadurch erhaltenen Werte an verbrauchter $\frac{n}{50}$ KOH werden in ein Koordinatensystem eingetragen. Führt man zu verschiedenen Zeiten derartige Titrationen durch, so erhält man eine Kurve, deren Verlauf den zeitlichen Zuwachs der durch Spaltung frei gewordenen Carboxylgruppen wiedergibt. Bei der graphischen Darstellung in den erwähnten Abbildungen wurde bereits die Zugabe von 0,1 n NaOH zum Nachstellen des pH-Wertes auf 8,2 berücksichtigt.

Alle im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Abbaueversuche an Prokollagen wurden über 14 - 16 Stunden durchgeführt. Das Verhältnis von Enzym zu Substrat betrug bei allen Ansätzen 1 : 100.

Nach Beendigung des tryptischen Abbaus am Prokollagen wird die Lösung mit n Essigsäure auf pH 5 gebracht und bis zum Auftreten der ersten Siedebällchen erhitzt; dadurch wird das überschüssige Enzym zerstört.

Die anschließend sofort abgekühlte Lösung wird von dem meist entstehenden schwachen Niederschlag in der Kältezentrifuge bei 0° C abzentrifugiert und schließlich gefriergetrocknet. Man erhält ein lockeres, in wässrigen Puffern gut lösliches weißes Pulver.

3. Elektrophoretische Trennung der Prokollagenpeptide

a) Trennung in der VA-Apparatur

Zur Auftrennung der aus den enzymatischen Abbauversuchen der Abschnitte B I. und B II. (S. 13 und 26) erhaltenen Prokollagenpeptide diente die von GRASSMANN und HANNIG beschriebene VA-Apparatur zur kontinuierlichen präparativen Elektrophorese (37). Das Peptidgemisch wurde in 4%iger Lösung (gelöst im entsprechenden Puffer) zur Trennung aufgetragen. Als Trägermaterial verwendete ich Schleicher-Schüll-Papier 604L/90g; die angelegte Spannung betrug bei Verwendung eines Pyridin-Eisessig-Wasser-Puffers vom pH 4,9 (100 ml Pyridin, 80 ml Eisessig, auf 30 l aufgefüllt) ca. 600 V bei 19 mA, bei Verwendung von 0,5 n Essigsäure (pH 2,4) 770 V bei 15 mA.

Die Lage der Fraktionen in den 42 Auffanggläschen wurde nach einer Methode von MOORE und STEIN (74) festgestellt; den zu prüfenden Gläsern werden jeweils 0,2 ml Lösung entnommen, die mit 1 ml 2,5 n Natronlauge versetzt und 2,5 h bei 90° C im Trockenschrank erhitzt werden; anschließend neutralisiert man die Proben mit 1 ml 30%iger Essigsäure, gibt zu jedem Gläschen 1 ml Ninhydrinreagenz (74) und beläßt dann die Lösung für eine Stunde bei 100° C im Trockenschrank. Die Extinktionen der einzelnen Proben werden im Colorimeter (z. B. Beckman-Gerät) gemessen und in ein Koordinatensystem eingetragen und zu einer Kurve ausgezogen (vgl. z. B. Abb. 3 oder Abb. 11). Auf Grund der entstehenden Verteilungskurve lassen sich dann die aufgefangenen Lösungen in Fraktionen zusammenfassen; nach der anschließenden Gefrieretrocknung werden die Peptide im evakuierten Exsikkator (Ölpumpe) über Phosphorpentoxyd und Kaliumhydroxyd im Kühlraum bei +4° C aufbewahrt.

b) Trennung in der VAP-Apparatur

Zur Auftrennung des nach Abschnitt B IV. (S. 38) mittels chymotrypsinfreiem Trypsin erhaltenen Peptidgemisches verwendete ich die aus der VA-Apparatur weiter entwickelte VAP-Apparatur (32).

Die VAP-Apparatur unterscheidet sich von der VA-Apparatur dadurch, daß man in ihr die etwa zwanzigfache Menge Substanz zur Trennung auftragen kann. Diese höhere Leistungsfähigkeit der VAP konnte dadurch erreicht werden, daß als Trägermaterial statt eines Filtrierpapierbogens ein schnellsaugender Filtrierpapierkarton von 2 - 3 mm Dicke verwendet wird; die Strömungsgeschwindigkeit der das Trägermaterial durchfließenden Pufferlösung kann somit erhöht werden, was andererseits eine gleichzeitige Erhöhung der Feldstärke ermöglicht. Die auftretende starke Joulesche Wärme wird durch eine besondere Kühlvorrichtung abgeführt.

Zur Trennung in der VAP-Apparatur wurden insgesamt 62 g Peptidgemisch (pro Tag 3 g, gelöst in 20 ml Puffer) aufgetragen. Als Trägermaterial diente der Filtrierpapierkarton Binzer 230. Bei Verwendung eines Pyridin-Eisessig-Wasser-Puffers vom pH 4,9 (vgl. a) betrug die Spannung 1200 V bei 175 mA, bei Verwendung von 0,5 n Essigsäure (pH 2,4) 1250 V bei 150 mA. Die Temperatur im Innern der Kammer wurde auf 18° C konstant gehalten. Das Testen der aufgefangenen Lösungen und ihre Weiterbehandlung erfolgte wie unter a) beschrieben.

4. Säulenchromatographische Trennung der Prokollagenpeptide

Die elektrophoretisch bei pH 4,9 und pH 2,4 vorgereinigten Peptide trennte ich in Ionenaustauschersäulen weiter auf. Im allgemeinen betrug die Länge der mit einem Heizmantel versehenen Säulen 150 cm, ihr Durchmesser 2 cm. Lediglich zur Reinigung der Fraktion S₈₆ und S₇₈ verwendete ich kleinere Säulen (Länge: 105 cm, Durchmesser: 0,9 cm). Als Füllmaterial diente der schwach basische Ionenaustauscher Dowex 1 x 2 (200 - 400 mesh), der in der Cl-Form geliefert wird. Der Ionenaustauscher wird zunächst zweimal mit n Ammoniak auf einer Nutsche G 3 gewaschen; über Nacht läßt man dann das Harz in 5 - 10%igem Pyridin stehen. Anschließend wird mit Wasser so lange gewaschen, bis die ablaufende Lösung neutral reagiert. Nach 30-minutenlangem Stehenlassen des Ionenaustauschers in Eisessig wäscht man auf der Nutsche wiederum mit Wasser neutral und siebt oder sedimentiert dann das Harz; die ganz feinen und sehr groben Teilchen werden verworfen.

Die Harzteilchen mittlerer Größe werden nochmals ein- oder zweimal mit Ammoniak, Pyridin und Eisessig wie beschrieben behandelt. Das auf diese Weise präparierte Harz wird in einer 1%igen Collidinlösung, die man mit Eisessig auf pH 8,0 gebracht hat, suspendiert und in die Säule gleichmäßig eingeschlemmt.

Auf die nach obigen Angaben hergestellte Säule kann man bis zu 60 μ Mol Peptid auftragen; die Arbeitstemperatur beträgt 35° C. Die verwendeten Elutionsmittel gehen aus dem folgenden Schema hervor:

<u>Fraktion</u>	<u>Elutionsmittel</u>	<u>Puffer-Mischgefäß</u>
S u. N	1. 1%iges Collidin (pH 8,0; 1 Tag)	→ Säule
	2. 0,1 n Essigsäure (ca. 1 Tag)	→ { 1%iges 2,4-Lutidin } ^x
	3. 1,0 n Essigsäure (ca. 1 Tag)	→ { 1%iges α -Picolin }
	4. 2,0 n Essigsäure (bis pH 3,0)	→ { 1%iges Pyridin } → Säule
	5. 2,0 n Essigsäure	→ Säule
B	1. 1%iges Collidin (pH 9,0 ⁺ ; 1 Tag)	→ Säule
	2. 1%iges Collidin (pH 8,6 ⁺ ; 1 Tag)	→ Säule
	3. 0,1 n Essigsäure (ca. 1 Tag)	→ { 1%iges Collidin }
	4. 1,0 n Essigsäure (ca. 1 Tag)	→ { 1%iges Pyridin }
	5. 2,0 n Essigsäure (bis pH 3,0)	→ { 1%iges 2,4-Lutidin } → Säule
	6. 2,0 n Essigsäure	→ Säule

Alle pH-Werte werden mit Eisessig eingestellt, außer:

⁺ in diesem Falle wird der pH-Wert mit Propionsäure eingestellt.

^x pH: 7,5 - 7,6.

Als Puffer-Mischgefäß verwendete ich eine Zweiliterflasche, deren Inhalt mit einem Magnetrührer gerührt wurde.

Zum Regenerieren des Ionenaustauschers wird das Harz auf der Nutsche mit Eisessig gewaschen, um es wieder in die Acetatform zurückzuführen. Nach Durchspülen mit Wasser bis zur Neutralreaktion kann der Austauscher wieder verwendet werden.

Die Elutionsgeschwindigkeit betrug etwa 30 ml/h, beim Rechromatographieren 20 ml/h; das Eluat wurde mit Hilfe eines Fraktionssammlers in Portionen von 6 ml, beim Rechromatographieren in 4 ml-Portionen aufgefangen; auch wurde beim Rechromatographieren zwischen 0,1 n Essigsäure und 1 n Essigsäure 0,5 n Essigsäure als Elutionsmittel

zwischen geschaltet, um ein langsames Ansteigen des pH-Gradienten zu erreichen.

Die im Fraktionssammler aufgefangenen Lösungen wurden mit Ninhydrin, wie auf S.69 beschrieben, getestet; die für jedes Gläschen in ein Koordinatensystem eingetragenen Extinktionswerte ergeben dann Verteilungskurven, auf Grund derer man die Fraktionen entsprechend sammeln kann (vgl. z. B. Abb. 16). Die anschließend gefriergetrockneten Peptide sind zum Teil stark salzhaltig (Collidin-, Pyridin-, Lutidin- oder Picolinacetat) und müssen daher vor der Weiterverarbeitung erst entsalzt werden.

5. Entsalzen der säulenchromatographisch getrennten Peptide

a) Entsalzen an Dowex 1 x 2

Der Ionenaustauscher Dowex 1 x 2 (200 - 400 mesh, Cl-Form) kann auch zum Entsalzen von Peptiden verwendet werden (83,84). 200 ml Harz werden zunächst zweimal in 2 n Natronlauge (zusammen 750 ml) suspendiert, mit Wasser neutral gewaschen und anschließend drei- bis viermal mit je 300 ml 4 n Salzsäure auf der Glasfilternutsche behandelt. Nach erneutem Waschen mit Wasser bis zur Neutralreaktion wird das Harz durch dreimalige Behandlung mit 2 n Natronlauge (zusammen etwa 1,25 l) wieder in die OH-Form übergeführt. In etwas Natronlauge aufgeschwemmt wird das Harz in die Säule 30 x 3 cm eingeschlemmt. Nachdem man noch etwa 100 - 150 ml 2 n Natronlauge hat durch die Säule laufen lassen, wird mit Wasser solange nachgespült, bis die unten austropfende Flüssigkeit neutral reagiert. Ist dies erreicht, so kann das in Wasser gelöste zu entsalzende Peptid - die Lösung muß neutral bis basisch reagieren - auf die Säule aufgetragen werden. Ca. 8 h läßt man destilliertes Wasser durchlaufen; anschließend wird mit 0,5 n Essigsäure nachgespült; die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 400 - 500 ml/h. Der ursprünglich braun aussehende Dowex hellt sich im sauren Milieu sichtbar auf (gelblich). An der deutlich zu erkennenden "Säuregrenze" wird das gesamte Peptid mitgeführt; es kann also ohne Verwendung eines Fraktionssammlers oder Indikators scharf aufgefangen werden. Die gesamte aufgetragene Peptidmenge befindet sich, wie Vorversuche ergaben, in den ersten 40 ml Eluat. -

Der gesamte Entsalzungsvorgang wird bei Zimmertemperatur durchgeführt.

Zum nachfolgenden Regenerieren des Austauschers heizt man die Säulen auf 45° C. Die Essigsäure wird zunächst mit 1 n Salzsäure verdrängt; anschließend wäscht man mit destilliertem Wasser bis zur Neutralreaktion nach. Schließlich wird wieder mit 2 n Natronlauge gespült, um das Harz in die OH-Form überzuführen.

Nach diesem Verfahren wurden die Fraktionen S₇₈ und S₈₆ (S. 41) entsalzt. Die zurückgewonnenen Fraktionen waren jedoch auf Grund ihrer papierchromatographischen Prüfung noch nicht salzfrei; aus der quantitativen Aminosäureanalyse war ein ungefährer Salzgehalt von 30 - 40 % zu ermitteln. Ferner ist zu erwähnen, daß die Löslichkeit der Substanzen in Wasser nach dem Entsalzen stark abnahm.

Zur Entsalzung weiterer Peptide wurde wegen der schlechten Ausbeuten (schätzungsweise 10 - 20 %) und wegen Abnahme der Löslichkeit der nicht quantitativ entsalzten zurückgewonnenen Substanzen dieses Verfahren nicht mehr verwendet.

b) Entsalzen an Sephadex

Der von PORATH (85) zum Entsalzen eingeführte Sephadex G 25 besteht aus kleinen Körnern einer hydrophilen, unlöslichen Substanz, die aus dem Polysaccharid Dextran durch Quervernetzung hergestellt werden; es bildet sich dabei ein dreidimensionales Netzwerk von Polysaccharidketten aus. Dieses Netzwerk hat nichtionischen Charakter; daß gewisse polare Verhältnisse vorliegen, ist fast ausschließlich auf den hohen Hydroxylgruppengehalt zurückzuführen.

Das trockene Sephadex-Pulver wird in einem Becherglas mit 0,05 m Natriumchloridlösung verrührt. Nach dem Sedimentieren dekantiert man die in der überstehenden Lösung befindlichen Teilchen ab. Die verbleibende Suspension wird zur Säulenfüllung verwendet. Eine sorgfältige Packung ist für die an diesen Säulen zu trennenden Substanzen von besonderer Wichtigkeit. Am besten füllt man die unten verschlossene Säule zu etwa einem Viertel mit Wasser von Zimmertemperatur und gibt dann die Sephadex-Suspension hinzu. Wenn die Teilchen eine Schichthöhe von etwa 5 cm gebildet haben, öffnet man die Säule unten in der Weise, daß ein langsamer Wasserstrom ausfließt.

Ist die Säule gefüllt, so spült man mit Wasser so lange, bis die austropfende Flüssigkeit salzfrei ist; man kann dies z. B. durch Leitfähigkeitsmessungen des Eluats prüfen. Das zu entsalzende Peptid wird oben aufgetragen, ohne die Füllung aufzuwirbeln. Als Elutionsmittel dient Wasser. Nachdem das Peptid im Eluat erschienen ist, spült man mit Wasser weiter, bis die austretende Lösung salzfrei ist. Anschließend kann man neues Substanzgemisch zum Entsalzen auftragen.

Diese Methode zur Abtrennung der Salze von den Peptiden beruht auf der unterschiedlichen Molekulargröße dieser beiden Stoffgruppen, weswegen man auch von einer "Gelfiltration" spricht (85). Die Arbeitsweise solcher mit Sephadex gefüllten Säulen kann man sich so vorstellen, daß die höhermolekularen Stoffe volumenmäßig zu groß sind, um in die zwischen den Gelteilchen vorhandenen Räume eindringen zu können; sie laufen also praktisch mit der Lösungsmittelfront durch die Säule hindurch. Kleinere Partikelchen dringen zunächst in die Zwischenräume der Säulenfüllung ein und werden je nach Größe früher oder später wieder herausgespült. - Nach diesem Verfahren gelang es PORATH und FLODIN (85), Serum von Ammoniumsulfat oder Glucose von Dextran zu trennen.

Von den in dieser Arbeit beschriebenen Peptiden wurden die Fraktionen S₁ bis S₈ an Sephadex (Säulenmaße: 30 x 3 cm) entsalzt. Die N-Fraktionen konnten nach diesem Verfahren nicht quantitativ entsalzt werden; sie enthielten auch nach dem Eluieren noch große Mengen Collidinacetat.

In einem Testversuch trug ich auf die Sephadex-Säule eine Mischung von Serum, Phenylalanin und Collidinacetatlösung auf; letztere Lösung wurde aus dem Puffermischgefäß, das bei den Trennungen der Fraktionen an Dowex 1 x 2 verwendet wird (S. 71), entnommen; in diesem Puffer-Mischgefäß befindet sich - zu dem Zeitpunkt, wo die N-Fraktionen eluiert werden - vor allem Collidin und Essigsäure, weiterhin wenig Lutidin, Picolin und Pyridin. Von dieser Mischung entge ich 50 ml auf etwa 5 ml ein und trug sie zusammen mit 1 ml Normalserum und 20 mg Phenylalanin auf die Sephadexsäule auf. Das Ergebnis der Trennung geht aus Abb. 20 hervor. Die Trennung der drei Komponenten ist nicht sehr gut. - Es ist naheliegend, daß, wenn man eine N-Fraktion aufträgt, die eventuell noch aus mehreren Komponenten besteht, der Peptidgipfel sich mit dem Gipfel des Collidinacetates überschneiden kann, so daß keine quantitative Entsalzung stattfindet.

Die B-Fraktionen konnten an Sephadex überhaupt nicht entsalzt werden, da sie unter den hier beschriebenen Bedingungen sehr stark ad-

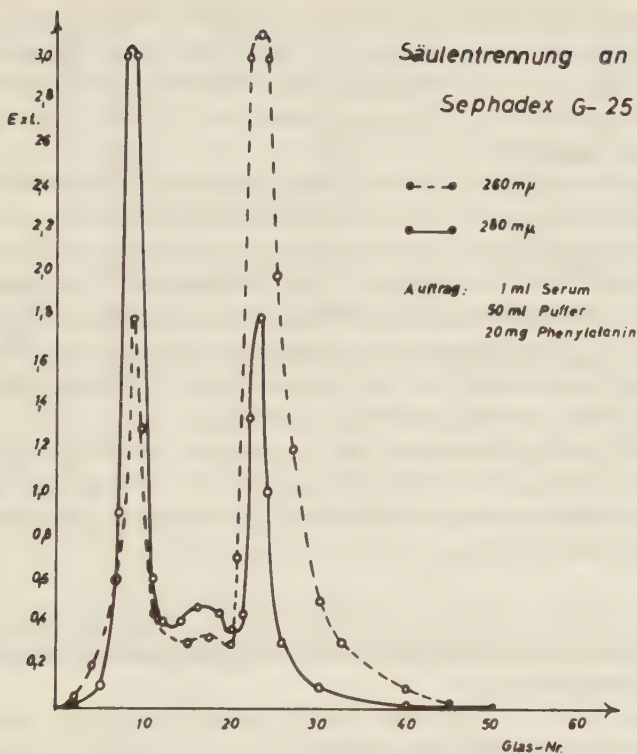


Abb. 20. Trennung von Serum, Collidinacetat und Phenylalanin an Sephadex G-25. Elutionsmittel: Wasser; 24 ml/h. Extinktionsmessungen bei 260 mμ (gestrichelte Kurve) und 280 mμ (ausgezogene Kurve).

sorbiert wurden und die eluierte Ausbeute an Peptid nur zwischen 20 und 30 % lag.

Auf Grund dieser Ergebnisse entsalzte ich die aus meinen Abbauversuchen gewonnenen neutralen und basischen Peptide durch Ausäthern.

c) Entsalzen durch Ausäthern

Die aus der Trennung an Dowex 1 x 2 erhaltenen neutralen (N) und basischen (B) Peptide wurden nach scharfem Trocknen im Exsikkator über Phosphorpentoxyd und Kaliumhydroxyd mit etwa 15 ml trockenem Äther (über CaCl₂ aufbewahrt) pro 100 mg salzhaltigem Peptid behandelt. Wie Extinktionsmessungen im Zeiß-Spektralphotometer (bei 260 mμ) des

zurückgewonnenen Äthers ergaben, ist bei dieser Behandlung (Schütteln) bereits das meiste Collidin in die Ätherschicht übergegangen (Extinktionen über 3,0). Messungen des Ätherauszugs im Beckman-Spektralphotometer bei 520 m μ zur Prüfung auf Peptide zeigten Extinktionen unter 0,05.

Nach erneutem Trocknen wurde der verbliebene Peptidrückstand in 8 - 10 ml Wasser gelöst und mit n/10 Natronlauge auf pH 8,0 gebracht. Die anschließend eingedampfte und getrocknete Lösung wurde nochmals mit etwa 15 ml trockenem Äther behandelt. Im allgemeinen zeigten der nun erhaltene Ätherrückstand sowie die wässrige Lösung der Peptide nur noch sehr geringe Extinktionen im UV (bei 260 m μ); ließen die Extinktionen noch auf größere Menge vorhandenen Collidins schließen, so wurde nochmals ausgeäthert.

Die anschließend getrockneten Peptide waren weitgehendst entsalzt; eventuelle geringe Spuren von Collidin, die durch Ausäthern nicht mehr zu entfernen waren, spielten bei den weiteren Untersuchungen der Peptide keine Rolle.

6. Papierchromatographische Trennung der Prokollagenpeptide und nachfolgende Elution

Viele Peptide, die nach der Rechromatographie an Dowex 1 x 2-Säulen papierchromatographisch noch immer aus mehreren Fraktionen bestanden, wurden für einen letzten Reinigungsschritt punktförmig auf Chromatographiepapier (Binzer Nr. 208) aufgetragen. Auf einem Bogen (30 cm breit, vom Rand her werden jeweils 2,5 cm freigelassen) kann man 25 Aufträge (Abstand jeweils 1 cm) mit zusammen 30 - 40 mg Peptid unterbringen. Als Laufmittel dient Butanol-Pyridin-Eisessig-Wasser (4 : 4 : 1 : 5). Nach dem Chromatographieren werden jeweils in Laufrichtung die beiden äußeren Aufträge und ein mittlerer Auftrag ausgeschnitten; die Streifen färbt man mit Ninhydrin an und legt sie mit den beiden nicht besprühten Blättern wieder zum vollständigen Chromatogramm zusammen, um die entsprechenden Streifen zur Elution **anzuzeichnen** (Abb. 21). Die zum Eluieren ausgeschnittenen Streifen **werden an den Schmalseiten** noch durch Papierstreifen (aus Chromatographiepapier Binzer Nr. 208) etwas verlängert und so zwischen zwei

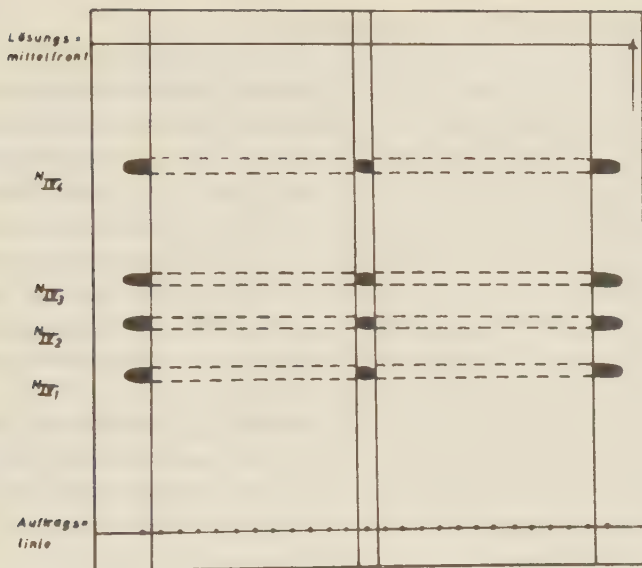


Abb. 21. Präparative Papierchromatographie. Beispiel: Fraktion N_{IV} . Außen- und Mittelstreifen mit Ninhydrin angefärbt; Papier: Binzer Nr. 208; Laufmittel: Butanol-Pyridin-Eisessig-Wasser (4 : 4 : 1 : 5).

Glasplatten gegeben, daß oben und unten jeweils 2 cm der Verlängerungsstreifen herausragen; es wird absteigend eluiert; der obere Streifen taucht in eine Wanne mit 0,5 n Essigsäure ein, aus dem unteren, spitz zugeschnittenen Streifen tropft das Eluat in ein kleines Kölbchen. Im allgemeinen befindet sich das Peptid in den ersten 25 ml des Eluats, das anschließend im Exsikkator am Hochvakuum über Phosphorpentoxyd und Kaliumhydroxyd eingeengt und getrocknet wird.

Im allgemeinen wurden nach diesem Verfahren papierchromatographisch reine Peptide erhalten. Da man jedoch die Flecke zum Eluieren scharf abgrenzen muß, ist dieses Verfahren mit beträchtlichen Substanzverlusten verbunden; die Ausbeuten lagen im allgemeinen bei 30 - 40 %. Wegen der oft nur geringen Ausbeuten der nach der Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen konnten nicht alle Peptide nach dieser Methode gereinigt werden, da die zu erwartende Ausbeute zu wenig lohnend erschien.

7. Prüfung der Peptide auf Einheitlichkeit

Die nach dem langwierigen Aufarbeitungsgang erhaltenen Abbaupeptide des Prokollagens prüfte ich zunächst papierchromatographisch auf Einheitlichkeit. Diese Tests wurden auf Papier der Firma Binzer (Nr. 208) oder der Firma Schleicher & Schüll (2043 bM) durchgeführt. Als Laufmittel verwendete ich Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5), Phenol-Kresol-Wasser (1 : 1 : 2) und Butanol-Pyridin-Eisessig-Wasser (4 : 4 : 1 : 5); ausschlaggebend war jeweils das Laufmittel, in dem das zu prüfende Peptid einen mittleren R_f -Wert zeigte; erschien das Peptid als ein einzelner, scharf begrenzter Fleck, so wurde es als einheitlich bezeichnet.

Erst ein papierchromatographisch als einheitlich festgestelltes Peptid wurde analysiert; ergaben die aus der Aminosäureanalyse gewonnenen Werte saubere, nahezu ganzzahlige stöchiometrische Verhältnisse, so bezeichnete ich das betreffende Peptid endgültig als rein und einheitlich.

8. Zur Berechnung der geschätzten Ausbeuten

Zur Berechnung des mengenmäßigen Anteils eines isolierten Peptids vom Gesamtabbaugemisch (in den Tabellen als in % geschätzte Menge angegeben) wurde - wie hier am Beispiel des Peptids N_{IV} beschrieben - folgendermaßen verfahren:

Die aus der ersten elektrophoretischen Trennung des tryptischen Abbaugemisches bei pH 4,9 erhaltenen Fraktionen wurden nach der Gefriertrocknung gewogen; da für die Elektrophorese nur verdünnte flüchtige Puffer verwendet wurden, ergaben diese Auswagen die wirklichen Ausbeuten; bei Annahme einer 100%igen Ausbeute erhält man durch Ermittlung der Gewichtsverhältnisse die Ausbeuten in relativen Prozenten. - Parallel dazu wurde das Verhältnis der erhaltenen Planimeterwerte der Extinktionskurven dieses Trennversuches, ebenfalls bezogen auf 100, ermittelt. Diese Verhältniszahlen stimmen mit der aus den Gewichten berechneten bei elektrophoretischen Trennungen weitgehend überein. Aus den so errechneten Mengenverhältnissen für die Fraktionen S, N und B ergab sich, daß die Fraktion N

60 % im Gesamtabbaugemisch ausmacht (vgl. Abb. 11, S. 40). In gleicher Weise wurde bei der elektrophoretischen Trennung der N-Fraktion bei pH 2,4 verfahren (vgl. Abb. 15, S. 44). Beispielsweise entsprach die Fraktion N_d 52 % der Gesamt-N-Fraktion; das sind, berechnet auf das Gesamtabbaugemisch, $\frac{60 \times 52}{100} = 31,2$ % geschätzte Menge.

Bei der nachfolgenden säulenchromatographischen Trennung wurden nur die Flächenwerte aus den Photometerkurven für die Berechnung der relativen Mengenverhältnisse herangezogen, da hier eine gewichtsmäßige Ausbeutenberechnung wegen des unterschiedlichen Salzgehaltes der eluierten Fraktionen nicht zweckmäßig ist. Da die Photometerkurven nach der Hydrolyse der Fraktionen und anschließender Ninhydrinfärbung erhalten wurden, konnten die Flächenwerte mit großer Genauigkeit den Mengenverhältnissen proportional gesetzt werden. An Hand einer solchen Berechnung ergab sich bei der säulenchromatographischen Trennung der N-Fractionen z. B. für das Peptid N_{IV} (vgl. Abb. 16, S. 44) eine relative Ausbeute von 19,1 %, bezogen auf die Fraktion N, und eine geschätzte Menge von 11,5 %, bezogen auf das Gesamtabbaugemisch.

Bei der anschließenden präparativen Papierchromatographie ergab sich eine weitere Auftrennung der Fraktion N_{IV} in vier Komponenten. Nach Elution der einzelnen Flecke und anschließender Gefriertrocknung konnten wieder die ausgewogenen Mengen zur Ausbeuteberechnung herangezogen werden, da die Peptide durch die papierchromatographische Trennung gleichzeitig entsalzt werden. In dem hier erwähnten Beispiel entstanden aus der Fraktion N_{IV} 2,2 % N_{IV1} , 3,9 % N_{IV2} , 2,4 % N_{IV3} und 3,0 % N_{IV4} , bezogen auf das Gesamtabbaugemisch (vgl. Tab. 10, S. 50).

II. Bausteinanalyse der in einheitlicher Form gewonnenen Abbaupeptide

1. Quantitative Aminosäureanalyse⁺

Abgesehen von den Peptiden S_a , S_b , S_c , S_d und B_1 des Prokollagenabbaus mit ungereinigtem Trypsin (S. 13), die mittels Kombination der Pa-

⁺ Vgl. Fußnote S. 51

pierelektrophorese und Papierchromatographie analysiert wurden (38), verwendeten wir für die Durchführung der Analysen aller in einheitlicher Form gewonnenen Peptide die von K. HANNIG entwickelte Apparatur zur quantitativen Aminosäurebestimmung an Ionenaustauschersäulen mit anschließender automatischer Registrierung der Ergebnisse (35).

2. Aminoendgruppenbestimmung

Die Bestimmungen der N-terminalen Aminosäuren in den durch tryptischen Abbau des Prokollagens gewonnenen Peptiden wurden unter Zugrundelegung der Arbeiten von SANGER (93) sowie SCHROEDER und LeGETTE (94) durchgeführt; die Aminosäuren wurden als DNP-Derivate⁺ chromatographisch identifiziert. 2 - 4 mg der zu untersuchenden Substanz wurden in 0,1 ml 1%iger Natriumcarbonatlösung gelöst. Nachdem man einen Überschuß (etwa doppelte Menge) an DNFB⁺ in Äthanol (0,5%ige Lösung) dazugegeben hat, schüttelt man das Reaktionsgemisch für 2 h im Dunkeln bei Zimmertemperatur (Schüttelapparat). Anschließend wird der Alkohol im Wasserstrahlvakuum sofort entfernt. Der Überschuß an DNFB wird mit Äther ausgeschüttelt. Nach der Zugabe von 1 - 2 ml 5,7 n Salzsäure wird das Kölbchen unter Stickstoff zugeschmolzen und das DNP-Peptid für etwa 8 h bei 100 - 105° C hydrolysiert; diese relativ kurze Hydrolysenzeit reicht aus, wenn man nur Glycin als Endgruppe erwartet (95). Anschließend wird mit Essigester ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird über Phosphorperoxyd und Kaliumhydroxyd getrocknet und getrennt chromatographiert. Die Essigesterphase wäscht man nochmals mit angesäuertem (Salzsäure) Wasser, dampft am Vakuum ein, nimmt in wenig Essigester auf und trägt im kalten Luftstrom zum Chromatographieren auf. Es wird entweder horizontal oder aufsteigend chromatographiert. Als Lösungsmittel wurden vor allem folgende verwendet:

- 1) Pyridin : iso-Amylalkohol : Wasser = 25 : 28 : 21 (einphasig)
nach HEYNS und KÖNIGSDORF (96)
- 2) Phenol : iso-Amylalkohol : Wasser = 1 : 1 : 1 (obere Phase)
nach BISERTE und OSTEUX (97)

⁺ DNP: Dinitrophenol;
DNFB: Dinitrofluorbenzol.

c) 1,5 m Phosphatpuffer vom pH 6,2 nach LEVY (98), hergestellt aus 156 g NaH_2PO_4 + 89 g Na_2HPO_4 auf einen Liter Wasser. Verwendet man die unter a) und b) angegebenen Lösungsmittel, so müssen zuvor die Chromatographierpapiere mit Phthalatpuffer vom pH 6 bzw. 5 getränkt und anschließend getrocknet werden. Der Phthalatpuffer vom pH 6 wird aus 50 ml 0,1 m Kaliumhydrogenphthalat + 45,5 ml 0,1 n Natronlauge, aufgefüllt auf 100 ml Wasser, hergestellt; der Phthalatpuffer vom pH 5 besteht aus 50 ml 0,1 m Kaliumhydrogenphthalat + 23,9 ml 0,1 n Natronlauge pro 100 ml Wasser (99).

Um die Aminoendgruppenbestimmung nach dieser Methode quantitativ durchzuführen, nimmt man nach dem Eindampfen der Essigesterphase statt in wenig Essigester in 100 - 300 λ Essigester auf, um davon dann einen aliquoten Teil zur horizontalen Chromatographie aufzutragen. Nach gutem Trocknen des Chromatogramms eluiert man mit 4 ml 1%iger Bicarbonatlösung den DNP-Glycin-Fleck und mißt das Eluat bei 360 μ gegen eine Bicarbonatlösung, mit der man reines Chromatographiepapier eluiert hat. Der erhaltene Extinktionswert des DNP-Glycins aus dem zu untersuchenden Peptid wird mit der Extinktion einer bekannten Menge eingesetzten DNP-Glycins verglichen.

Testversuche haben ergeben, daß nach Überführung des Peptids Gly-Phe-Ala in die DNP-Verbindung unter den oben beschriebenen Bedingungen die Ausbeute an DNP-Glycin nach der Hydrolyse des DNP-Peptids etwa 40 % beträgt (vgl. dazu auch z. B. TURBA (95)). Dieser Wert wurde durch Kontrollversuche an dem Peptid Gly-Pro-Ala mit guter Reproduzierbarkeit bestätigt. - Die hier beschriebenen Werte sind auf eine 40%ige Ausbeute berechnet.

Berechnung des Molekulargewichtes aus der Aminoendgruppenbestimmung am Beispiel der Fraktion N_{VII} :

Einwaage:	1,5 mg scharf getrocknetes, völlig salzfreies Peptid.
Umsetzung:	wie oben beschrieben; in 200 λ Essigester aufgenommen; 30 λ (= 225 μ) zur Papierchromatographie aufgetragen; nach Entwicklung des Chromatogramms Elution des DNP-Glycinflecks mit 4 ml 1%iger Bicarbonatlösung.
Test:	370 λ DNP-Glycin in 100 ml 1%iger Bicarbonatlösung gelöst; 4 ml (= 14,8 μ) zur Messung entnommen.
Extinktions-	DNP-Glycin aus Peptid: 0,111
messung(360 μ):	DNP-Glycin aus Test: 0,229

Berechnung I: $0,229 : 14,8 = 0,111 : x$
 $x = 7,16$ DNP-Glycin (aus Peptid)
In μMol : $241 \mu\text{Mol}$ DNP-Glycin = $1 \mu\text{Mol}$
 $7,16 \mu\text{Mol}$ DNP-Glycin = $0,0297 \mu\text{Mol}$

$$\mu\text{Mol} = \frac{\text{Einwaage}}{\text{Molekulargewicht}};$$

$$\text{Molekulargewicht} = \frac{\text{Einwaage}}{\mu\text{Mol}} = \frac{225}{0,0297} = 7575$$

Da die Ausbeute an DNP-Glycin im Mittel jedoch nur 40 % beträgt (vgl. oben), so ergibt sich unter Berücksichtigung dieses Verlustes nur ein

Molekulargewicht von 3030.

Berechnung II: Es gelten dieselben Zahlen wie unter Berechnung I. Demnach sind aus $225 \mu\text{Mol}$ Peptid auf Grund der Extinktionsmessungen $0,0297 \mu\text{Mol}$ DNP-Glycin entstanden; dieser Wert gibt jedoch nur die Ausbeute von 40 % an; bei einer 100%igen Ausbeute wären $0,0743 \mu\text{Mol}$ DNP-Glycin entstanden. - Das aus der Aminosäureanalyse errechnete Mindestmolekulargewicht für die Fraktion N VII beträgt 9013.
Wenn nun auf $225 \mu\text{Mol}$ Peptid $0,0743 \mu\text{Mol}$ Glycin entfallen, dann ergeben sich für $9013 \mu\text{Mol}$ Peptid (= $1 \mu\text{Mol}$ Peptid)

$$\frac{0,0743 \times 9013}{225} = \underline{2,98 \text{ Mol Glycin.}}$$

Dieses Ergebnis bedeutet, daß auf $1 \mu\text{Mol}$ Peptid $2,98$ (= 3) Glycinreste als Aminoendgruppe entfallen. Nimmt man für dieses Peptid eine Dreierkettenkonfiguration an, so enthält jede Kette 1 Glycin als N-terminale Aminosäure. Das durchschnittliche Molekulargewicht beträgt dann pro Kette $9013 : 2,98 =$

3030.

In den Aminosäuretabellen ist jeweils das nach diesen Berechnungen ermittelte Molekulargewicht in der Rubrik "MG (Sanger)" eingetragen.

3. Carboxylendgruppenbestimmung

a) Bestimmung der C-terminalen Aminosäure mit Hydrazin

Der Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren mittels Hydrazinolyse liegt eine Arbeit von AKABORI und Mitarbeitern zugrunde (100 - 102). Man wiegt 2 - 5 mg des zu untersuchenden Peptids in ein Hydrolysenkölbchen ein. Die anschließend nochmals scharf getrocknete Probe (über P_2O_5 am Hochvakuum) wird dann mit der 10- bis 50fachen Menge

Hydrazin versetzt; das verwendete Hydrazin muß sehr rein sein, vor allem aber vollkommen wasserfrei. Nach der Hydrazinzugabe wird das Hydrolysenkölbchen unter Evakuierung sofort abgeschmolzen und im Trockenschrank bei 105°C für 8 - 10 h der Hydrazinolyse unterworfen. Nach dem Abkühlen wird das Kölbchen geöffnet und sofort in einem Eksikkator über konz. Schwefelsäure an der Hochvakuumpumpe getrocknet. Anschließend nimmt man in 0,5 ml Wasser auf und versetzt mit der doppelten Menge Essigester, den man vorher mit p-Nitrobenzaldehyd gesättigt hat (102). Während des folgenden kräftigen Schüttelns (1 - 2 h an der Schüttelmaschine) bilden sich die schwerlöslichen Schiffischen Basen. Das Reaktionsgemisch wird nötigenfalls abfiltriert und dann mehrere Male mit Äther und Essigester ausgeschüttelt (nach Möglichkeit sollen alle diese Arbeitsgänge rasch hintereinander ausgeführt werden). In der schließlich sauberen wässrigen Phase befinden sich nur noch die freien Aminosäuren. Nach dem Einengen der wässrigen Lösung über P_2O_5 chromatographiert man aufsteigend oder horizontal, wobei man eine Testlösung mit den als Endgruppe in Frage kommenden Aminosäuren mitlaufen läßt. Als Laufmittel wurden verwendet:

1. Phenol : Kresol : Wasser (1 : 1 : 2)
2. Phenol : 0,2%igem Ammoniak (gesättigt)
3. Butanol : Eisessig : Wasser (4 : 1 : 5)

In einigen Fällen wurde auch eine Direktbestimmung der C-terminalen Aminosäuren, die man vorher in die DNP-Derivate übergeführt hat, nach HEYNS und LEGLER (103) durchgeführt.

In einigen Fällen (z. B. $\text{N}_{\text{IV}1}$, $\text{N}_{\text{IV}2}$, $\text{N}_{\text{III}d}$, N_{VII} u. a.) wurde als C-terminale Aminosäure sowohl Arginin als auch Lysin ermittelt, obwohl das Peptid als einheitlich bezeichnet worden war.

Wurden die zunächst mit Ninhydrin und dann mit Kupferreagenz angesprühten Flecke mit Methanol eluiert und die Extinktionen der Eluate im Colorimeter bei 504 m μ gemessen, so betrug in allen diesen Fällen das Verhältnis der Argininwerte zu denen des Lysins etwa 1 : 2 oder 2 : 1; an Peptiden, die nur Arginin oder Lysin als C-terminale Aminosäure aufwiesen, konnte gezeigt werden, daß nicht ein Molekül dieser Aminosäure, sondern ca. drei Moleküle abgespalten worden waren. Diese Bestimmungen wurden folgendermaßen durchgeführt:

Man unterwirft in einem Parallelversuch zur Bestimmung der C-terminalen Aminosäure eines Peptids durch Hydrazinolyse die zu erwartende Aminosäure (genau eingewogene Menge) genau denselben oben beschriebenen Versuchsbedingungen. Zum Schluß werden die beiden wässrigen Phasen - die des Peptidversuches und des Aminosäuretestes - nebeneinander chromatographiert, angefärbt, eluiert und colorimetrisch bestimmt. Durch die gleichen Berechnungen - wie vorher für die quantitative Aminoendgruppenbestimmung angegeben - kann man nun aus den gemessenen Extinktionen und den aufgetragenen Mengen des Peptids und des Testes entweder das Molekulargewicht oder die Anzahl der Endgruppen errechnen; letztere Berechnung ist hier geeigneter, da in vielen Fällen zwei Aminosäuren C-terminal auftraten.

So wurden z. B. für die Fraktion Nv₁₁ 0,047 μ Mol Arginin aus den Extinktionen des zur Chromatographie aufgetragenen Peptids (200) und Testes ermittelt. Wenn also auf 200 μ Peptid 0,047 μ Mol Arginin entfallen, so ergeben sich für 9013 μ Peptid (= 1 μ Mol Nv₁₁)

$$\frac{0,047 \times 9013}{200} = 2,12 \text{ Mol Arginin.}$$

Ferner trat bei diesem Peptid bei der Chromatographie ein Lysinfleck auf, der ebenfalls eluiert und berechnet wurde; er entsprach 0,0173 μ Mol (pro 200 μ Peptid), d. h. auf 1 μ Mol Peptid (9013 μ) entfallen

$$\frac{0,0173 \times 9013}{200} = 0,78 \text{ Mol Lysin.}$$

Aus dieser Berechnung ist zu schließen, daß das Peptid Nv₁₁ - wie schon aus der Aminoendgruppenbestimmung ermittelt - noch aus 3 Ketten besteht, von denen 2 Ketten Arginin und 1 Kette Lysin carboxylendständig haben.

In den Aminosäuretabellen sind jeweils die abgerundeten Werte für Arginin und Lysin in der Rubrik "C-terminal" eingetragen.

b) Bestimmung der C-terminalen Aminosäure mit Arginase

Die für diese Bestimmungen verwendete Arginase wurde von O. JANOWSKY (40,41) hergestellt. Die für die C-terminale Aminosäurebestimmung verwendete Vorschrift wurde denselben Arbeiten entnommen.

Die eingesetzte Menge Peptid wird so gewählt, daß unter Zugrundelegung der aus der Aminosäureanalyse ermittelten Kettenlänge eine Harnstoffabspaltung von 10 - 15 % (bezogen auf das anwesende Arginin) mit Sicherheit erkannt werden müßte. Als Lösungsmittel wird jeweils 1 ml $\equiv$ 100 Phosphatpuffer vom pH 7,4 verwendet. Diese Substratlösung versetzt man mit so viel Arginase, daß das Verhältnis Enzym :

Substrat = 1 : 10 ist. Nach 48stündiger Inkubation bei 37° C ist der Abbau beendet. Nach Zugabe von 1,33 ml Eisessig und 0,15 ml 5%iger methanolischer Xanthhydryllösung wird der Harnstoff gefällt und nach Reinigung und Trocknen in 50%iger Schwefelsäure aufgenommen, worauf eine gelbe Lösung entsteht, deren Extinktion 20 min nach der Schwefelsäurezugabe mit dem Kolorimeter bei 405 m μ gemessen wird. Als Blindwert dient eine 50%ige Schwefelsäure. Zur Extinktion läßt sich dann an Hand einer Eichkurve der Harnstoffstickstoffwert ablesen, aus dem man dann Rückschlüsse auf die Anwesenheit von Arginin ziehen kann.

4. Enzymatischer Abbau mit Aminopolypeptidase

Für den stufenweisen Abbau der Aminosäuren vom Aminoende eines Peptids her wurde die von E. WEBER hergestellte Aminopolypeptidase verwendet (42).

Es werden soviel mg des zu untersuchenden Peptids in 0,2 ml m/30 Phosphatpuffer (pH = 7,2) (vgl. Küster-Thiel) gelöst, daß in 0,01 ml Lösung 0,05 μ Mol Substanz enthalten sind. Das Substrat-Enzym-Verhältnis soll 50 : 1 betragen. Die Abbaulösung wird in einen Thermostaten von 37° C gebracht. Ferner wird eine weitere Probe Substratlösung, jedoch ohne Enzymzusatz, gleichzeitig in den Thermostaten eingesetzt. Letztere Lösung dient als Blindprobe, um festzustellen, ob das eingesetzte Peptid im Verlauf des Abbaus auch ohne Enzymzusatz einer gewissen Hydrolyse unterliegt. Von dieser Lösung wird zu Beginn des Versuchs und nach Abschluß desselben eine Probe von 0,01 ml auf das Abbauchromatogramm aufgetragen.

Aus der Substrat-Enzym-Lösung werden in bestimmten Zeitabständen jeweils 0,01 ml entnommen und in einer Breite von 3 cm strichförmig zum Chromatographieren auf Schleicher & Schüll-Papier 2043 bM aufgetragen. Gleichzeitig mit der letzten Probenentnahme werden weitere 0,01 ml für ein zweidimensionales Chromatogramm entnommen; als Laufmittel für dieses Chromatogramm dient in der ersten Richtung Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5), in der zweiten Dimension Phenol-o-Kresol-Wasser (1 : 1 : 2). Auf Grund dieses Chromatogramms

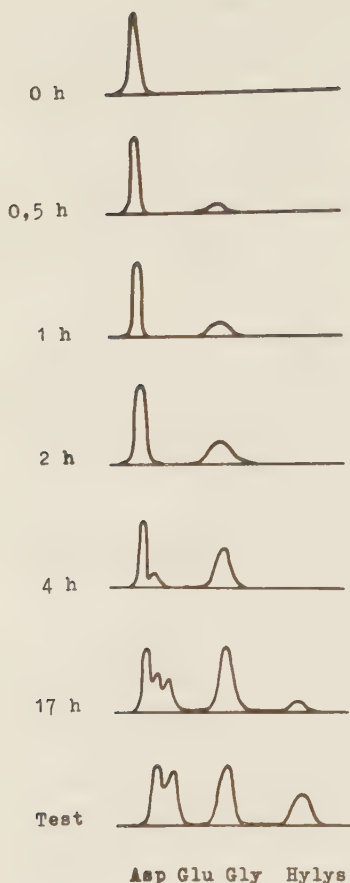


Abb. 22. Abbau der Fraktion S₂ bzw. S₈₆ mit Aminopolypeptidase. Papier: Schleicher & Schüll 2043 bM; Laufmittel: Phenol-Kresol-Wasser (1 : 1 : 2). Erläuterung siehe Text.

kann man nach Ansprühen mit Ninhydrinreagenz feststellen, welche Aminosäuren durch das Enzym abgespalten worden sind. Von den so ermittelten Aminosäuren wiegt man für eine Testmischung soviel ein, daß in 0,01 ml Lösung von jeder Aminosäure 10 - 20 µg enthalten sind. - 0,01 ml dieser Testlösung werden auf dasselbe Chromatogramm wie die zu bestimmten Zeiten entnommenen Proben der Substrat-Enzym-Lösung aufgetragen. Das Blatt mit diesen einzelnen Proben wird aufsteigend im Laufmittel Phenol-o-Kresol-Wasser (1 : 1 : 2) chromatographiert. Nach dem anschließenden Trocknen und Besprühen mit Ninhydrinreagenz wird das Chromatogramm in 3 cm breite Streifen geschnitten, und zwar derart, daß sich auf jedem Streifen der Auftrag einer Probe und die darüberliegenden abgespaltenen Aminosäuren befinden. Um diese Streifen photometrisch auswerten zu können, werden sie zunächst mit einer Mischung von α-Bromnaphthalin + Paraffinöl (Brechungsindex: 1,51) durchsichtig gemacht; anschließend werden die Extinktionswerte mit einem Photometer bei 550 mµ gemessen. Die erhaltenen Extinktionskurven werden ausplanimetriert. Durch Vergleich der Werte des Teststreifens mit den eingewogenen Aminosäuren zu den Wert

ten der abgespaltenen Aminosäuren kann man die Menge der letzteren quantitativ ermitteln (38).

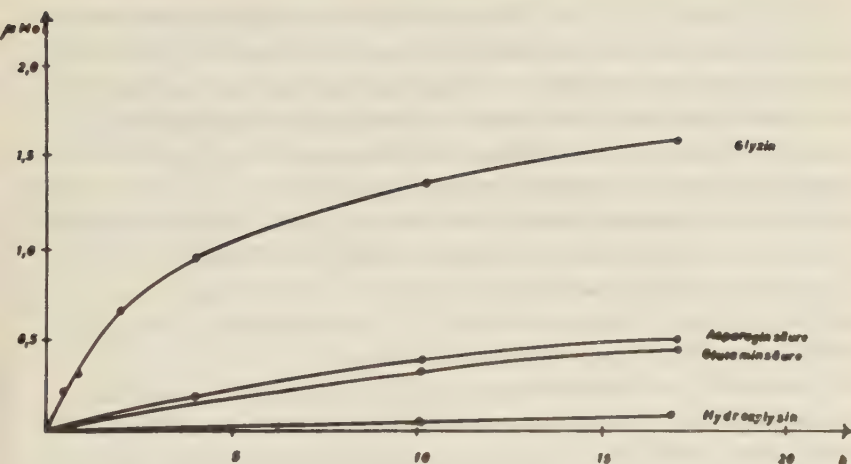


Abb. 23. Abbau der Fraktion S_a bzw. S_{86} mit Aminopolypeptidase. Abzisse: μ Mol abgespaltene Aminosäuren; Ordinate: Inkubationszeit.

In Abb. 22 sind am Beispiel der Fraktion S_a bzw. S_{86} (S. 18 u. 55) die den zu verschiedenen Zeiten aufgetragenen Proben entsprechenden Kurven wiedergegeben, während Abb. 23 das Ergebnis der Auswertung dieser Kurven, nämlich die abgespaltenen μ Mole der einzelnen Aminosäuren in Abhängigkeit von der Zeit zeigt. Glycine tritt eindeutig als erste Aminosäure auf und erreicht bereits nach etwa 4 h den Wert von 1 μ Mol. Als zweite Aminosäure folgt Asparaginsäure, die jedoch wesentlich langsamer abgespalten wird. Im gleichen Maße, wie Asparaginsäure frei wird, treten auch Glutaminsäure und weitere Mengen Glycine auf; weiterhin wird noch Hydroxylysin abgespalten. Auf Grund des erhaltenen Kurvenbildes (Abb. 23) habe ich vorgeschlagen, daß zwischen den Aminosäuren Glutaminsäure und Hydroxylysin noch ein Glycine steht (S. 18 u. 55).

5. Enzymatischer Abbau mit Carboxypeptidase A

Carboxypeptidase A wird als wässrige Suspension bei ca. 5° C in einer Konzentration von 15 - 20 mg Enzym/ml aufbewahrt. 0,01 ml dieser Sus-

pension werden mit 0,05 ml 10%iger Lithiumchloridlösung versetzt.

Von der zu untersuchenden Substanz werden soviel mg in 0,2 ml Trispuffer vom pH 7,40 (bei 37° C) gelöst, daß in 0,01 ml 0,05 μ Mol Peptid enthalten sind. Der Puffer wird hergestellt aus 250 ml 0,2 n Trispuffer (24,23 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan pro Liter + 400 ml 0,1 n HCl, mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Von den 0,2 ml Substratlösung nimmt man 0,1 ml ab, trägt davon 0,01 ml für ein Chromatogramm auf, ergänzt den Rest wieder mit 0,01 ml Lithiumchlorid-Enzym-Lösung, trägt eine 0,01 ml Probe auf, stellt den Rest in einen Thermostaten von 37° C und entnimmt in bestimmten Zeitabständen Proben zum Chromatographieren.

Die zweiten 0,1 ml Substratlösung, die ohne Enzym geblieben sind, läßt man ebenfalls während der Versuchsdauer im Wasserbad und entnimmt ihr am Schluß des Versuches 0,01 ml für das Chromatogramm, um festzustellen, ob bereits ohne Enzym Hydrolyse eingetreten ist.

Die Methodik der Chromatographie und des anschließenden Auswertens ist hier dieselbe wie im vorhergehenden Abschnitt für den Abbau mit Aminopolypeptidase beschrieben.

Ein Abbau mit Carboxypeptidase A führte lediglich bei der Fraktion S_f (S. 22) zu einem Erfolg, da hier keine basische Aminosäure am Carboxylende steht; Carboxypeptidase A vermag Lysin und Arginin nicht abzubauen, weswegen sie bei Anwendung auf die Peptide, die durch Abbau des Prokollagens mit gereinigtem Trypsin gewonnen worden waren (S. 38 ff.), kein positives Ergebnis erbringen konnte.

6. Enzymatischer Abbau mit Carboxypeptidase B

Carboxypeptidase B (104) vermag im Gegensatz zu Carboxypeptidase A C-terminal Arginin und Lysin abzuspalten, und zwar selektiv, d. h., nichtbasische carboxylendständige oder in Position 2 nach Arginin oder Lysin folgende Aminosäuren werden durch Carboxypeptidase B nicht abgespalten.

Für den enzymatischen Abbau eines Peptids mit Carboxypeptidase B soll das Verhältnis vom Enzym zum Substrat 1 : 100 - 150 sein. 0,1 ml aus Procarboxypeptidase B frisch hergestellte Carboxypepti-

dase-B-Lösung⁺ (= 0,06 mg Protein) werden mit 0,1 ml 10%iger Natriumchlorid-Lösung und 0,3 ml Trispuffer (0,05 m; vgl. umseitig unter Absatz 5.) vom pH 7,4 (bei 37° C) versetzt; dann gibt man 0,5 ml (entsprechend 10 mg Peptid) Lösung des zu untersuchenden Peptids dazu und setzt das Untersuchungsgläschen in einen Thermostaten von 37° C. - Im Verlaufe dieser Arbeit wurden wegen Substanzmangels nur wenige rein qualitative Untersuchungen mit Carboxypeptidase B durchgeführt (vgl. Fraktion S₁, S. 56).

III. Trennung von Trypsin und Chymotrypsin

1. Säulenchromatographische Trennung von Trypsin und Chymotrypsin

Um Trypsin säulenchromatographisch vom Chymotrypsin und eventuellen anderen Verunreinigungen zu trennen, wählte ich die zur Reinigung von anderen basischen Enzymen (Chymotrypsin, Lysozym usw., vgl. S. 30) aus der Literatur (50) bekannten Bedingungen. Ich verwendete eine Säule von 30 cm Länge und 0,9 cm Durchmesser, die mit Kationenaustauscher IRC-50 (120 - 150 mesh, Natriumform) gefüllt war. Zur Vorbereitung des Ionenaustauschers wird das Harz zunächst in Wasser suspendiert, um die feinen Anteile abzuschlemmen. Nach etwa 30 min hat sich das Harz abgesetzt, und die überstehende Suspension kann abgegossen werden. Diesen Prozeß wiederholt man so oft, bis nach 30minutenlangem Absitzenlassen die überstehende Lösung klar erscheint. Anschließend wird das Harz durch Behandlung mit 2 n Natronlauge auf einer Nutsche in die Natriumform übergeführt und mit destilliertem Wasser so lange gewaschen, bis die abtropfende Flüssigkeit neutral reagiert. Dann behandelt man das Harz mit 2 n Salzsäure und wäscht wiederum neutral. Nachdem die Behandlung mit Natronlauge und Salzsäure noch einmal wiederholt worden ist,

⁺ Die Carboxypeptidase B wurde in unserem Institut in der Abteilung Hannig nach dem Verfahren von FOLK und GLADNER (105) hergestellt.

bringt man das Harz wieder in seine Natriumform. Bevor das Harz in die Säule gefüllt wird, suspendiert man es in dem Puffer, der als erstes Elutionsmittel verwendet werden soll. Man läßt das Harz absitzen, gießt die überstehende Lösung ab, suspendiert von neuem usw., bis die überstehende Lösung nur noch etwa 1 - 2 Einheiten vom pH-Wert der zugegebenen Pufferlösung abweicht. Anschließend wird das Harz in etwa zwei Volumina Pufferlösung suspendiert und in kleinen Portionen in die Chromatographiesäule gegeben; vor jeder neuen Zugabe läßt man das Harz ruhig absetzen. - Die verwendeten Chromatographiesäulen waren unten mit einer Quarzfritte versehen, auf der sich der Austauscher absetzen konnte; unter der Fritte verjüngte sich das Füllrohr zu einem kapillaren Ausfluß. Als Elutionsmittel verwendete ich einen von BOARDMAN und PARTRIDGE (75) angegebenen Phosphatpuffer vom pH 5,67, hergestellt aus 1000 ml einer Lösung von 27,22 g KH_2PO_4 pro Liter Wasser und 80 ml einer Lösung von 35,60 g Na_2HPO_4 pro Liter Wasser. Die Arbeitstemperatur betrug $+4^\circ \text{C}$, die Elutionsgeschwindigkeit 1,5 ml/h. Das Eluat wurde in einem Fraktionsteiler in Portionen von 1,5 ml gesammelt. Es wurden drei Versuche mit den Aufträgen 20 mg Trypsin - 20 mg Chymotrypsin - 20 mg Trypsin + 20 mg Chymotrypsin durchgeführt. Den aufgefangenen Fraktionen wurden aliquote Teile entnommen, um sie mit Ninhydrin auf Eiweiß zu testen. Nachdem die ninhydrinpositiven Komponenten festgestellt waren (Abb. 6, S. 31), wurden aus den entsprechenden Gläschen nochmals aliquote Teile des Eluats entnommen und auf Trypsinaktivität nach RIEDEL und WÜNSCH (53) geprüft (S. 91); dieser Test verlief bei jedem Versuch negativ. Das Fehlen der proteolytischen Aktivität erkläre ich mir damit, daß die für die Stabilität und Aktivität des Trypsins notwendigen Calciumionen (55 - 57,59,63 - 67) entweder durch den Kationenaustauscher oder den verwendeten Phosphatpuffer gebunden werden und somit dem Enzym nicht mehr im ausreichenden Maße zur Verfügung stehen. Eine nachträgliche Reaktivierung durch Vorlage von 0,033 m Calciumchloridlösung führte zu keinem positiven Ergebnis. Da auch die Trennung der beiden Enzyme, wie aus Abb. 6 (S. 31) hervorgeht, nicht als sehr gut bezeichnet werden kann, wurden keine weiteren Versuche zu einer eventuellen Verbesserung der Methode unternommen.

2. Elektrophoretische Trennung von Trypsin und Chymotrypsin (31)

Zur Reinigung des käuflichen Trypsins in der kontinuierlichen Elektrophoreseanordnung nach GRASSMANN und HANNIG (VA-Apparatur) diente als Trennbogen Schleicher-Schüll-Papier 2040a. Die Trennung erfolgte bei 520 V und 26 mA unter Verwendung eines Puffers vom pH 6,1 aus 150 ml Pyridin und 10 ml Eisessig in 5 l Wasser. Für die Trennung wurden 300 mg Trypure-Novo (krist. reines Trypsin; stabilisiert; Aktivität: 0,171 Anson-Einheiten/mg Protein-N) in 15 ml des gleichen Puffers gelöst und innerhalb von 48 Stunden dem Trennbogen an geeigneter Stelle zugeführt. Die unten aus dem Bogen austretenden Fraktionen wurden in 42 Gläschen gesammelt und die Verteilung der Proteinkomponenten durch Entnahme von aliquoten Teilen (0,5 ml) mittels Ninhydrinreaktion nach vorheriger alkalischer Hydrolyse festgestellt (Abb. 7, S. 32). Die Aktivitätsverteilung in den 42 Gläschen wurde mit aliquoten Teilen, wie unter 3. und 4. beschrieben, erhalten.

3. Aktivitätsbestimmung des Trypsins

a) Nach RIEDEL und WÜNSCH (53)

2 ml Veronalpuffer nach MICHAELIS (106) vom pH 8,2 und 0,1 ml der zu testenden Trypsinlösung, mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt, wurden zunächst bei 37° C temperiert. Hatte ich feste Substanzen auf Trypsinaktivität zu testen, so löste ich 5 mg in 20 ml Wasser und entnahm dieser Lösung 0,2 ml zur Bestimmung.

Als Substrat für Trypsin diente N^ε-Benzoyl-DL-arginin-8-naphthylamidhydrochlorid, von dem ich 8 mg in einem Gemisch von 2 ml Methanol und 8 ml Wasser löste. Für jede Bestimmung verwendete ich 1 ml dieser Lösung. Nach genau zweistündiger Inkubation bei 37° C gab ich 4 ml frisch bereitete Echtsblausalz-B-Lösung (1 mg Echtsblau B in 1 ml Wasser gelöst) hinzu. Genau 5 min danach wurde 1 ml 80%ige Trichloroessigsäure der Lösung zugefügt, gut durchgeschüttelt, mit 10 ml Essigester versetzt und bei etwa 0° C abzentrifugiert. Die überstehende Essigesterphase wurde schließlich bei 540 mμ in Spektralphotometer (Beckman) gemessen.

b) Nach der ANSON-Methode (73)

Als Substrat diente ein Hämoglobinpräparat der Behring-Werke, Marburg (Lahn). Der Abbau des Hämoglobins wurde bei pH 7,5 und 25° C durchgeführt. Die Extinktion wurde 10 min nach Zugabe des Phenolreagenzes gegen eine Tyrosin-Standard-Lösung bei 546 m μ gemessen. Die Meßergebnisse wurden entsprechend der Vorschrift von Anson ausgewertet.

4. Aktivitätsbestimmung des Chymotrypsins (54)

Als Substrat für Chymotrypsin diente N α -Benzoyl-DL-phenylalanin- β -naphthylamid. Der Verlauf des Testes zur Aktivitätsbestimmung des Chymotrypsins war genau der gleiche wie unter 3. für Trypsin beschrieben, außer daß ich das Substrat in reinem Aceton löste und statt bei 37° C bei 4° C arbeitete.

D. Zusammenfassung

1. In Anlehnung an einen früher mitgeteilten Versuch (29) zur Sequenzermittlung von Prokollagen wurde ein enzymatischer Abbau von Prokollagen mit handelsüblichem kristallinem Trypsin durchgeführt, wobei auf Grund der Titration der freigesetzten Carboxylgruppen theoretisch ca. 160 Peptide mit einer mittleren Kettenlänge von 18 Aminosäuren zu erwarten waren. Durch präparative elektrophoretische Trennungen unter verschiedenen Bedingungen habe ich sechs Peptide elektrophoretisch und papierchromatographisch rein gewinnen können, die auf Grund der Aminosäureanalysen mit den früher beschriebenen identisch waren; es konnten jedoch weitere Ergebnisse zur Sequenzuntersuchung erbracht werden.
Eine Carboxylendgruppenbestimmung am Gesamtabbaugemisch ergab außer den erwarteten Aminosäuren Arginin und Lysin noch Asparaginsäure, Valin und Alanin.
Elektrophoretische Trennmethode reichten nicht aus, eine größere Anzahl einheitlicher Peptide aus dem tryptischen Abbau von Prokollagen zu gewinnen.
2. Ein enzymatischer Abbau von Prokollagen mit gleichen Teilen Trypsin und Chymotrypsin ergab theoretisch 260 Peptide mit einer mittleren Kettenlänge von 12 Aminosäuren. Auf Grund der zu wenig unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeit dieser Peptide war es nicht möglich, durch präparative Papierelektrophorese das Abbaugemisch bis zu einheitlichen Peptiden aufzutrennen.
3. Um ein spezifisch spaltendes Trypsin für einen neuen Prokollagenabbau zur Verfügung zu haben, wurde ein Verfahren zur Reinigung dieses Enzyms ausgearbeitet. Die vollständige Abtrennung des stets das Trypsin begleitenden Chymotrypsins konnte in einem präparativen elektrophoretischen Verfahren bei pH 6,1 (Pyridin-Essigsäure-Puffer) und einer Feldstärke von 13 V/cm erreicht werden. Die Steigerung der tryptischen Aktivität, bezogen auf 1 mg Protein-N, betrug 19 % gegenüber dem Ausgangsmaterial.

4. Prokollagen wurde mit elektrophoretisch gereinigtem Trypsin enzymatisch abgebaut; eine Carboxylendgruppenbestimmung am Gesamtabbaugemisch ergab nur Arginin und Lysin; eine entsprechende Aminoendgruppenbestimmung zeigte, daß lediglich Glycin als N-terminale Aminosäure auftritt. Es sind also nur Bindungen zwischen Arginin bzw. Lysin und Glycin gespalten worden.
5. Die tryptinspaltbaren Bindungen entsprechen nur etwa 60 % derjenigen, an denen die beiden basischen Aminosäuren mit ihren Carboxylendgruppen beteiligt sind. Der Rest von 40 % ist völlig tryptinresistent. Es wird angenommen, daß es sich dabei um Bindungen an den Imino-Stickstoff des Prolins und Hydroxyprolins handelt.
6. Eine weitgehende Auftrennung des aus ca. 160 Peptiden mit einer mittleren Kettenlänge von 18 Aminosäuren bestehenden Abbaugemisches gelang dadurch, daß die elektrophoretische Trennmethode unter verschiedenen Bedingungen durch die Einführung der präparativen Säulenchromatographie am Anionenaustauscher Dowex 1 x 2 und durch präparative Papierchromatographie ergänzt wurde.
7. Es konnten durch Kombination dieser Trennverfahren 114 Peptide gewonnen werden, von denen 55 als elektrophoretisch, säulen- und papierchromatographisch einheitlich bezeichnet werden konnten. An 51 Peptiden wurden quantitative Aminosäurebestimmungen, an 18 Peptiden Endgruppenbestimmungen - zum Teil quantitativ - und an 10 Peptiden Sequenzermittlungen durchgeführt.
8. Von unwesentlichen Ausnahmen abgesehen, enthalten alle isolierten Peptide etwa ein Drittel ihrer Aminosäuren als Glycin. Dies spricht für eine sehr gleichmäßige Verteilung des Glycins über das Kollagenmolekül.
9. In einem großen Teil der Peptide konnte die Aminosäureanordnung bestimmt werden. Diese Befunde zeigen in ihrer Gesamtheit ein wechselweises Auftreten prolin- und hydroxyprolinreicher apolarer und an Iminosäuren armer polarer Bereiche. In letzteren wurden teils vorwiegend basische und teils vorwiegend saure Bezirke angetroffen.

Damit konnten innerhalb der Kette mit chemischen und enzymatischen Methoden Bereiche derjenigen Zusammensetzung nachgewiesen werden, wie man sie einerseits für die kristallin geordneten "Interbands", andererseits für die weniger geordneten "Bands" der Kollagenfibrille auf Grund elektronenmikroskopischer und zum Teil röntgenoptischer Befunde vermutet hat.

10. Auf Grund meiner Ergebnisse muß für einen großen Teil der gewonnenen Prokollagenpeptide eine Dreierkettenkonfiguration angenommen werden.

Begründung:

- a) Bei Zugrundelegung eines aus der quantitativen Aminosäureanalyse erhaltenen Mindestmolekulargewichtes ermittelt man bei der quantitativen Aminoendgruppenbestimmung statt eines N-terminalen Glycinrestes drei N-terminale Glycinreste, bzw. man errechnet pro Glycinrest ein Molekulargewicht, das nur ein Drittel des aus der Aminosäureanalyse ermittelten Mindestmolekulargewichtes beträgt.
- b) Bei der Carboxylendgruppenbestimmung ermittelt man ebenfalls bei der Zugrundelegung eines aus der Aminosäureanalyse erhaltenen Mindestmolekulargewichtes entweder 3 gleiche Aminosäuren (Lysin oder Arginin) oder Lysin und Arginin im Verhältnis 1 : 2 oder umgekehrt.
- c) Beim stufenweisen Abbau der Peptide vom Aminoende her treten in vielen Fällen mehrere Aminosäuren mit gleicher oder sehr ähnlicher Geschwindigkeit auf.
- d) Statt der erwarteten Kettenlänge von 18 Aminosäuren pro Peptid hatten die gewonnenen Peptide gemäß ihrer Aminosäuresummenzusammensetzung ein durchschnittliches Mindestmolekulargewicht von etwa 60 Aminosäuren, also etwa das Dreifache.

E. Literatur

1. W. Graßmann u. H. Hörmann, Z. physiol. Chem. 292, 24 (1953)
2. J. H. Bowes u. J. A. Moss, Biochem. J. 55, 735 (1953)
3. K. Heyns u. W. Königsdorf, Z. physiol. Chem. 295, 244 (1953)
4. C. Deasy, J. Am. Leather Chem. Assoc. 51, 584 (1956)
5. W. Graßmann u. H. Schleich, Biochem. Z. 277, 320 (1935)
6. F. Schneider, Collegium (Darmstadt) 1940, S. 97
7. J. Gross, J. H. Highberger u. F. O. Schmitt, Proc. Soc. expl. Biol. med. 80, 462 (1952)
8. R. E. Glegg, D. Eidinger u. C. P. Leblond, Science 118, 614 (1954)
9. W. Graßmann u. J. Trupke in "Physiologische Chemie", herausgegeben v. B. Flaschenträger, Bd. I, S. 584, u. zw. S. 661, Springer Verlag, Heidelberg 1951
10. R. S. Bear, Advances in Protein Chemistry 7, 69 (1952)
11. R. S. Bear, R. S. Morgan in "Connective Tissue", ed. by Tunbridge, S. 321, Blackwell, Oxford 1957
12. K. Kühn, W. Graßmann u. U. Hofmann, Z. Naturforsch. 13b, 154 (1958)
13. K. Kühn, U. Hofmann, W. Graßmann u. E. Gebhard, Naturwissenschaften 45, 521 (1958)
14. K. Kühn, W. Graßmann u. U. Hofmann, Z. Naturforsch. 14b, 436 (1959)
15. J. Gross, J. H. Highberger u. F. O. Schmitt, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 40, 679 (1954)
16. J. Gross, J. H. Highberger u. F. O. Schmitt, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 41, 1 (1955)
17. H. Boedtker u. P. Doty, J. Am. Chem. Soc. 78, 4267 (1956)
18. A. Rich u. F. H. C. Crick, Nature 176, 915 (1955)
19. F. H. C. Crick u. A. Rich in "Recent Advances in Gelatin and Glue Research" (G. Stainsby, ed.), S. 20, Pergamon Press, New York 1958
20. L. Pauling u. R. B. Corey, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 37, 272 (1951)
21. G. N. Ramachandran u. G. Kartha, Nature 174, 269 (1954); 176, 593 (1955)
22. M. L. Huggins, J. Am. Chem. Soc. 76, 4045 (1954); Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 43, 209 (1957)
23. J. T. Randall, J. Soc. Leather Trades' Chemists 38, 362 (1954)
24. F. O. Schmitt, J. Gross u. J. H. Highberger, Symp. Soc. Exp. Biol. 9, 148 (1955)

25. K. Kühn, W. Graßmann u. U. Hofmann, *Naturwissenschaften* 47, 258 (1960)
26. F. O. Schmitt u. A. J. Hodge, *Leder* 11, 74 (1960)
27. F. O. Schmitt, J. Gross u. J. H. Highberger, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 39, 459 (1953)
28. P. Doty u. T. Nishihara in "Recent Advances in Gelatin and Glue Research" (G. Stainsby, ed.), S. 92, Pergamon Press, New York 1958
29. W. Graßmann, K. Hannig, H. Endres u. A. Riedel, *Z. physiol. Chem.* 306, 123 (1956)
30. W. Graßmann, Beiträge zur Silikoseforschung Sonderband 1, S. 137, 1955
31. W. Graßmann, K. Hannig u. M. Schleyer, *Z. physiol. Chem.* 316, 71 (1959)
32. K. Hannig, *Z. physiol. Chem.* 311, 63 (1958)
33. W. Graßmann, *Svensk Kemisk Tidskrift* 72, 275 (1960)
34. W. N. Orekhovitsch, A. A. Tustanovsky, K. D. Orekhovitsch u. N. J. Plotnikowa, *Biochemija (UdSSR)* 13, 55 (1948)
35. K. Hannig, *Clin. Chim. Acta* 4, 51 (1959)
36. I. H. Bowes, R. G. Elliot u. J. A. Moss in Randall "Nature and Structure of Collagen", London 1953
37. W. Graßmann u. K. Hannig, *Naturwissenschaften* 37, 397 (1950)
Z. physiol. Chem. 292, 32 (1952)
38. W. Graßmann, K. Hannig u. M. Plöckl, *Z. physiol. Chem.* 299, 258 (1955)
39. M. G. Engel u. F. Engel, *J. biol. Chem.* 167, 535 (1946)
40. O. Janowsky, Dissertation 1958, München
41. W. Graßmann, H. Hörmann u. O. Janowsky, *Z. physiol. Chem.* 312, 273 (1958)
42. E. Weber, Diplomarbeit 1958, München
43. M. Kunitz u. J. H. Northrop, *J. gen. Physiol.* 19, 991 (1936)
44. J. H. Northrop, M. Kunitz u. R. M. Harriot in "Crystalline Enzymes", 2nd Ed., Columbia Univ. Press, New York 1948
45. R. R. Redfield u. C. B. Anfinsen, *J. biol. Chem.* 221, 385 (1936)
46. C. Gabeloteau u. P. Desnuelle, *Bull. Soc. Chim. biol.* 40, 35 (1958)
47. E. Nikkilä, K. Ekholm u. H. Silvola, *Acta chem. scand.* 6, 617 (1952)

48. J. H. Northrop u. M. Kunitz in E. Abderhalden "Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden", Abt. IV, Teil II, S. 2213, Verlag Urban & Schwarzenberg, München 1936
49. J. I. Harris, Nature 177, 471 (1956)
50. S. Moore u. W. H. Stein, Advances in Protein Chemistry 11, 195 (1956)
51. H. H. Tallan, Biochim. biophys. Acta 27, 407 (1958)
52. P. J. Keller, E. Cohen u. H. Neurath, J. biol. Chem. 230, 905 (1958)
53. A. Riedel u. E. Wünsch, Z. physiol. Chem. 316, 61 (1959)
54. H. A. Ravin, Ph. Bernstein u. A. M. Seligman, J. biol. Chem. 208, 1 (1954)
55. L. W. Cunningham jr., J. biol. Chem. 211, 13 (1954)
56. M. Bier u. F. F. Nord, Arch. Biochem. Biophysics 33, 320 (1951)
57. M. Bier u. F. F. Nord, Nature 171, 1022 (1953)
58. S. N. Timasheff, J. M. Sturtevant u. M. Bier, Arch. Biochem. Biophysics 63, 243 (1956)
59. F. F. Nord u. M. Bier, Biochim. biophys. Acta 12, 56 (1953)
60. J. C. Perrone, L. V. Disitzer u. G. Domont, Nature 183, 605 (1959)
61. R. J. Black, E. L. Durrum u. G. Zweig in "A Manual Paper Chromatography and Paper Electrophoresis", Academic Press, Inc., New York 1955
62. J. Charney u. R. M. Tomarelli, J. biol. Chem. 171, 501 (1947)
63. L. Gorini, Biochim. biophys. Acta 7, 318 (1951)
64. L. Gorini u. F. Felix, Biochim. biophys. Acta 11, 535 (1953)
65. M. M. Green u. H. Neurath, J. biol. Chem. 204, 379 (1953)
66. M. M. Green, J. A. Gladner, W. L. Cunningham jr. u. H. Neurath, J. Am. Chem. Soc. 74, 2122 (1952)
67. J. A. Duke, M. Bier u. F. F. Nord, Arch. Biochem. Biophysics 40, 424 (1952)
68. B. G. Malmström in "The Mechanism of Metal-Ion Activation of Enzymes", Almquist & Wiksells Boktryckeri, AB, Uppsala 1956; Arch. Biochem. Biophysics 70, 58 (1957)
69. B. G. Malmström, T. Vännegård u. M. Larsson, Biochim. biophys. Acta 30, 1 (1958)
70. H. Erlennmeyer, H. v. Hahn u. E. Sorkin, Helv. chim. Acta 34, 1419 (1951)
- M. Kunitz u. J. H. Northrop, J. gen. Physiol. 17, 591 (1934)

72. L. W. Cunningham jr., F. Tietze, N. M. Green u. H. Neurath,
Discuss. Faraday Soc. 13, 58 (1953)
73. M. L. Anson, J. gen. Physiol. 22, 79 (1938)
74. C. H. W. Hirs, S. Moore u. W. H. Stein, J. biol. Chem. 219, 623 (1956)
75. N. K. Boardman u. S. M. Partridge, Biochem. J. 59, 543 (1955)
76. C. H. W. Hirs, W. H. Stein u. S. Moore, J. biol. Chem. 221, 151 (1956)
77. H. H. Tallan u. W. H. Stein, J. biol. Chem. 200, 507 (1953)
78. S. Moore u. W. H. Stein, J. biol. Chem. 211, 893 (1954)
79. W. A. Schroeder, L. M. Kay, J. LeGette, L. Honnen u. F. C. Green,
J. Am. Chem. Soc. 76, 3556 (1954)
80. L. M. Kay u. W. A. Schroeder, J. Am. Chem. Soc. 76, 3564 (1954)
81. Y. P. Dowmont u. J. S. Fruton, J. biol. Chem. 197, 271 (1952)
82. B. Liebold, K. Hilse, V. Rudloff u. G. Braunitzer, Ang. Chem. 71,
376 (1959)
83. W. H. Stein, J. biol. Chem. 201, 45 (1953)
84. A. Drèze u. A. de Boeck, Arch. Internat. Physiol. 60, 201 (1952)
85. J. Porath u. P. Flodin, Nature 183, 1657 (1959)
86. K. Hannig, IV. Colloquium Sint Jans Hospital, Brügge, Mai 1955,
Diskussionsbemerkung
87. K. Hannig, in Vorbereitung
88. W. Graßmann, K. Hannig u. P. Pollack, unveröffentlicht
89. W. Graßmann, K. Hannig, A. Nordwig u. M. Schleyer, in Vorbereitung
90. L. Grimm, Dissertation 1960, München
91. A. Veis u. J. Cohen, Nature 186, 720 (1960)
92. W. Graßmann, J. Janicki u. F. Schneider in "Stiasny Festschrift
1937", S. 74, Eduard Roether Verlag, Darmstadt 1937
93. F. Sanger, Biochem. J. 39, 507 (1945)
94. W. A. Schroeder u. J. LeGette, J. Am. Chem. Soc. 75, 4612 (1953)
95. F. Turba in "Chromatographische Methoden der Protein-Chemie",
S. 286, Springer-Verlag, Heidelberg 1954
96. K. Heyns u. W. Königsdorf, Z. physiol. Chem. 295, 244 (1953)
97. G. Biserte u. R. Osteux, Bull. Soc. Chim. biol. 33, 50 (1951)
98. A. Levy, Nature 174, 126 (1954)
99. S. Blackheim u. J. A. Lowther, Biochem. J. 48, 126 (1951)
100. S. Akabori, K. Ohno u. K. Narita, Bull. Chem. Soc. Japan 25,
214 (1952)
101. K. Ohno, J. Biochemistry (Tokio) 40, 621 (1953); 41, 345 (1954)

- 102. G. Braunitzer, Chem. Ber. 88, 2025 (1955)
- 103. K. Heyns u. G. Legler, Z. physiol. Chem. 305/306, 165 (1956/57)
- 104. J. A. Gladner u. J. E. Folk, J. biol. Chem. 231, 393 (1958)
- 105. J. E. Folk u. J. A. Gladner, J. biol. Chem. 231, 379 (1958)
- 106. E. Wiedemann in Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch d. physiol.-
u. pathol.- chem. Analyse, 10. Auflg. Bd. I, S. 54, u. zw. S. 85,
Springer-Verlag, Heidelberg 1953

F. Tabellarischer Anhang

(Aminosäureanalysen der in einheitlicher Form gewonnenen
Prokollagenpeptide)

Fraktion S₇₈

As.	Mol %	Ver- hältn.	Abger. Werte
Gly	34,8	13,0	13
Ala	7,5	2,9	3
Pro	8,8	3,2	3
Hypro	6,0	2,2	2
Asp	16,1	6,0	6
Glu	12,7	4,8	5
Lys	5,0	1,9	2
Arg	9,1	3,3	3
Summe	100,0	37,3	37
MG (Analyse): 4208			
MG (Sanger): -			
N-terminal: Gly			
C-terminal: -			

Fraktion S₈₆

As.	Mol %	Ver- hältn.	Abger. Werte
Gly	40,8	5,0	5
Thr	6,7	0,8	1
Asp	15,2	1,9	2
Glu	24,2	3,0	3
Hyllys	5,9	0,7	1
Arg	7,2	0,9	1
Summe	100,0	12,3	13
MG (Analyse): 1321			
MG (Sanger): 1200			
N-terminal: Gly			
C-terminal: Arg			

Fraktion S₁

As.	Mol %	Ver- hältn.	Abger. Werte
Gly	32,7	19,0	19
Ala	3,4	2,0	2
Ser	1,8	1,0	1
Pro	12,0	7,0	7
Hypro	14,0	8,1	8
Asp	26,0	15,1	15
Glu	3,0	1,8	2
Arg	7,1	4,1	4
Summe	100,0	58,1	58
MG (Analyse): 6528			
MG (Sanger): 2300			
N-terminal: Gly			
C-terminal: Arg			

Fraktion S₂

As.	Mol %	Ver- hältn.	Abger. Werte
Gly	32,5	19,0	19
Ala	9,9	5,8	6
Val	3,9	2,2	2
Leu	4,4	2,7	3
Isoleu	3,7	2,1	2
Ser	1,9	1,1	1
Pro	7,3	4,2	4
Hypro	7,3	4,2	4
Asp	14,7	8,7	9
Glu	6,2	3,6	4
Lys	3,3	2,0	2
Arg	4,9	2,9	3
Summe	100,0	58,5	59
MG (Analyse): 5498			
MG (Sanger): -			
N-terminal: Gly			
C-terminal: -			

Fraktion S₄

As.	Mol %	Ver- hältn.	Abger. Werte
Gly	33,8	20,0	20
Ala	6,6	3,9	4
Val	1,8	1,1	1
Ileu	2,8	1,8	2
Ser	1,8	1,1	1
Thr	3,3	2,0	2
Pro	14,8	8,8	9
Hypro	9,8	5,8	6
Asp	1,7	1,0	1
Glu	18,9	11,2	11
Lys	4,7	2,8	3
Summe	100,0	59,5	60
MG (Analyse): 5528 MG (Sanger): - N-terminal: Gly C-terminal: Lys			

Fraktion S₅

As.	Mol %	Ver- hältn.	Abger. Werte
Gly	32,4	11,8	12
Ala	16,5	6,0	6
Pro	18,7	6,9	7
Hypro	5,1	1,9	2
Asp	6,8	2,8	3
Glu	15,4	6,1	6
Arg	5,1	1,9	2
Summe	100,0	37,4	38
MG (Analyse): 3468 MG (Sanger): 3350 N-terminal: Gly C-terminal: Arg			

Fraktion N_{IA}

As.	Mol %	Ver- hältn.	Abger. Werte
Gly	31,8	8,1	8
Ala	8,3	2,1	2
Val	3,6	0,9	1
Ser	4,7	1,2	1
Pro	30,6	7,8	8
Hypro	12,7	3,2	3
Asp	4,0	1,0	1
Lys	4,3	1,1	1
Summe	100,0	25,4	25
MG (Analyse): 2158 MG (Sanger): - N-terminal: - C-terminal: -			

Fraktion N_{IB1}

As.	Mol %	Ver- hältn.	Abger. Werte
Gly	29,1	18,0	18
Ala	4,5	2,8	3
Val	1,9	1,2	1
Ser	8,6	5,3	5
Pro	34,8	21,8	22
Hypro	9,9	6,1	6
Asp	2,1	1,3	1
Glu	4,1	2,6	3
Lys	5,0	3,1	3
Summe	100,0	62,2	62
MG (Analyse): 5496 MG (Sanger): - N-terminal: - C-terminal: -			

Fraktion N_{IB2}

As.	Mol %	Ver- hältn.	Abger- Werte
Gly	31,2	27,2	27
Ala	7,8	6,9	7
Ileu	3,2	2,8	3
Ser	9,3	8,1	8
Thr	5,3	4,7	5
Pro	25,1	22,0	22
Hypro	13,4	11,8	12
Lys	4,7	4,1	4
Summe	100,0	87,6	88
MG (Analyse): 8005			
MG (Sanger): -			
N-terminal: -			
C-terminal: -			

Fraktion N_{IC}

As.	Mol %	Ver- hältn.	Abger- Werte
Gly	30,0	32,8	33
Ala	13,6	14,9	15
Val	2,9	3,2	3
Ileu	2,4	2,7	3
Ser	1,7	1,9	2
Pro	27,6	30,1	30
Hypro	9,5	10,3	10
Asp	5,8	6,3	6
Glu	0,9	1,0	1
Lys	1,6	1,8	2
Hyls	2,0	2,2	2
Arg	2,0	2,2	2
Summe	100,0	109,4	109
MG (Analyse): 6101			
MG (Sanger): -			
N-terminal: -			
C-terminal: -			

Fraktion N_{ID}

As.	Mol %	Ver- hältn.	Abger- Werte
Gly	32,7	38,0	38
Ala	10,6	12,3	12
Val	4,2	4,9	5
Leu	1,6	1,8	2
Ileu	1,9	2,2	2
Phe	0,9	1,0	1
Ser	4,5	5,2	5
Thr	0,9	1,0	1
Pro	23,2	27,0	27
Hypro	7,7	9,0	9
Asp	3,2	3,8	4
Glu	3,2	3,8	4
Lys	2,0	2,3	2
Hyls	1,6	1,8	2
Arg	1,8	2,1	2
Summe	100,0	116,2	116
MG (Analyse): 10146			
MG (Sanger): -			
N-terminal: -			
C-terminal: -			

Fraktion N_{IE}

As.	Mol %	Ver- hältn.	Abger- Werte
Gly	34,6	32,0	32
Ala	15,3	14,1	14
Val	3,4	3,1	3
Ileu	1,4	1,2	1
Thr	2,0	1,9	2
Pro	27,0	25,0	25
Hypro	7,6	7,0	7
Asp	3,2	3,0	3
Glu	2,3	2,1	2
Lys	3,2	2,9	3
Summe	100,0	92,3	92
MG (Analyse): 7660			
MG (Sanger): -			
N-terminal: -			
C-terminal: -			

Fraktion N_{IF}

As.	Mol %	Ver- háln. n.	Abger. Werte
Gly	32,4	42,1	42
Ala	16,0	20,8	21
Val	2,3	3,0	3
Ileu	2,9	3,8	4
Ser	0,6	0,8	1
Thr	1,8	2,3	2
Pro	23,9	31,0	31
Hypro	8,2	10,7	11
Asp	4,5	5,9	6
Glu	3,6	4,7	5
Lys	0,9	1,1	1
Hyls	1,6	2,0	2
Arg	1,3	1,8	2
Summe	100,0	130,0	131
MG (Analyse): 13261			
MG (Sanger): -			
N-terminal: -			
C-terminal: -			

Fraktion N_{IG}

As.	Mol %	Ver- háln. n.	Abger. Werte
Gly	33,7	38,9	39
Ala	12,3	14,3	14
Val	1,6	1,8	2
Leu	1,5	1,7	2
Ileu	1,6	1,8	2
Ser	3,4	3,9	4
Thr	1,9	2,2	2
Pro	23,3	26,9	27
Hypro	9,2	10,7	11
Asp	3,3	3,8	4
Glu	4,4	5,1	5
Lys	1,1	1,2	1
Hyls	0,7	0,8	1
Arg	2,0	2,3	2
Summe	100,0	115,4	116
MG (Analyse): 9998			
MG (Sanger): -			
N-terminal: -			
C-terminal: -			

Fraktion N_{IH1}

As.	Mol %	Ver- háln. n.	Abger. Werte
Gly	32,4	28,1	28
Ala	13,7	11,9	12
Val	1,2	1,0	1
Leu	2,6	2,3	2
Phe	1,2	1,1	1
Ser	4,6	4,0	4
Thr	0,9	0,8	1
Pro	10,7	9,3	9
Hypro	12,8	11,1	11
Asp	5,1	4,3	4
Glu	10,1	8,8	9
Lys	1,5	1,3	1
Arg	3,2	2,8	3
Summe	100,0	86,8	86
MG (Analyse): 9258			
MG (Sanger): -			
N-terminal: -			
C-terminal: -			

Fraktion N_{IH2}

As.	Mol %	Ver- háln. n.	Abger. Werte
Gly	35,2	17,1	17
Ala	14,3	7,0	7
Val	1,8	0,9	1
Leu	2,0	1,0	1
Ser	5,6	2,7	3
Thr	2,3	1,1	1
Pro	16,2	7,9	8
Hypro	8,3	4,1	4
Asp	4,4	2,1	2
Glu	9,9	4,8	5
Summe	100,0	48,7	49
MG (Analyse): 4166			
MG (Sanger): -			
N-terminal: -			
C-terminal: -			

Fraktion N_{IJ}

As.	Mol %	Ver- háln. n.	Abger. Werte
Gly	32,3	15,2	15
Ala	11,0	5,2	5
Val	1,4	0,7	1
Leu	2,0	1,0	1
Phe	1,5	0,7	1
Ser	3,9	1,9	2
Thr	1,8	0,9	1
Pro	18,5	8,8	9
Hypro	10,7	5,1	5
Asp	2,7	1,3	1
Glu	11,0	5,2	5
Lys	1,2	0,6	1
Arg	2,0	0,9	1
Summe	100,0	47,5	48
MG (Analyse): 4348,78			
MG (Sanger): -			
N-terminal: -			
C-terminal: -			

Fraktion N_{IIIc}

As.	Mol %	Ver- háln. n.	Abger. Werte
Gly	33,5	24,1	24
Ala	18,6	13,3	13
Leu	1,2	0,9	1
Ileu	3,8	2,7	3
Phe	4,3	3,1	3
Ser	1,5	1,1	1
Thr	2,2	1,7	2
Pro	7,6	5,3	5
Hypro	12,3	8,9	9
Asp	5,4	3,9	4
Glu	1,0	0,8	1
Lys	1,3	0,9	1
Hyllys	1,7	1,2	1
His	1,5	1,1	1
Arg	4,1	2,9	3
Summe	100,0	71,9	72
MG (Analyse): 6466			
MG (Sanger): -			
N-terminal: Gly			
C-terminal: -			

Fraktion N_{IIId}

As.	Mol %	Ver- háln. n.	Abger. Werte
Gly	25,0	17,1	17
Ala	17,8	12,2	12
Val	1,7	1,1	1
Leu	3,2	2,2	2
Ileu	7,6	5,2	5
Phe	3,9	2,7	3
Ser	2,6	1,8	2
Thr	3,1	2,1	2
Pro	2,5	1,7	2
Hypro	15,7	10,8	11
Asp	3,9	2,7	3
Glu	5,8	4,0	4
Lys	1,9	1,3	1
Arg	5,3	3,7	4
Summe	100,0	68,6	69
MG (Analyse): 6493			
MG (Sanger): -			
N-terminal: Gly			
C-terminal: -			

Fraktion N_{IV1}

As.	Mol %	Ver- háln. n.	Abger. Werte
Gly	39,2	11,2	11
Ala	7,0	2,0	2
Val	3,3	1,0	1
Ser	12,1	3,3	3
Pro	3,6	1,0	1
Hypro	6,5	1,9	2
Asp	7,5	2,1	2
Glu	11,0	3,1	3
Lys	6,3	1,8	2
Arg	3,5	1,0	1
Summe	100,0	28,4	28
MG (Analyse): 2499			
MG (Sanger): 870			
N-terminal: Gly			
C-terminal: 1,8 Lys, 1,0 Arg			

Fraktion N_{IV2}

As.	Mol %	Ver- háln. n.	Abger. Werte
Gly	36,3	20,0	20
Ala	11,6	5,8	6
Val	1,5	0,8	1
Ser	1,8	1,0	1
Pro	18,0	9,9	10
Hypro	3,8	2,1	2
Asp	5,9	3,2	3
Glu	10,3	5,7	6
Lys	7,2	3,9	4
Arg	3,6	2,0	2
Summe	100,0	54,4	55
MG (Analyse): 4915			
MG (Sanger): 1700			
N-terminal: Gly			
C-terminal: 1,9 Lys, 0,9 Arg			

Fraktion N_{IV3}

As.	Mol %	Ver- háln. n.	Abger. Werte
Gly	34,5	11,8	12
Ala	6,5	2,2	2
Val	5,1	1,8	2
Ser	5,6	1,9	2
Thr	2,4	0,8	1
Pro	14,5	5,0	5
Hypro	2,7	0,9	1
Asp	4,9	1,7	2
Glu	14,5	5,0	5
Lys	3,3	1,1	1
Arg	6,0	2,1	2
Summe	100,0	34,3	35
MG (Analyse): 3330			
MG (Sanger): 1100			
N-terminal: Gly			
C-terminal: 0,9 Lys, 2,2 Arg			

Fraktion N_{IV4}

As.	Mol %	Ver- háln. n.	Abger. Werte
Gly	32,1	16,0	16
Ala	4,3	2,0	2
Val	2,3	1,0	1
Leu	3,9	1,9	2
Ileu	2,3	1,1	1
Phe	6,6	3,1	3
Ser	6,3	2,9	3
Pro	12,7	5,9	6
Hypro	10,7	6,9	7
Asp	2,1	1,1	1
Glu	5,7	3,0	3
Lys	9,2	3,9	4
His	1,8	0,9	1
Summe	100,0	49,7	50
MG (Analyse): 4630			
MG (Sanger): 1200			
N-terminal: Gly			
C-terminal: Lys			

Fraktion N_{VIc}

As.	Mol %	Ver- háln. n.	Abger. Werte
Gly	30,0	23,2	23
Ala	9,3	7,0	7
Val	6,5	5,1	5
Leu	8,1	6,2	6
Ileu	1,0	0,8	1
Phe	1,3	1,0	1
Ser	8,8	6,8	7
Thr	9,3	7,0	7
Met	3,7	2,8	3
Pro	8,1	6,0	6
Hypro	5,4	4,1	4
Asp	2,5	2,0	2
Lys	3,5	2,8	3
Arg	2,5	1,9	2
Summe	100,0	76,7	77
MG (Analyse): 6936			
MG (Sanger): 2400			
N-terminal: Gly			
C-terminal: Arg			

Fraktion N_{VIe2}

As.	Mol %	Ver- háln.	Abger. Werte
Gly	31,3	25,8	26
Ala	11,0	9,1	9
Leu	1,4	1,2	1
Phe	1,0	0,8	1
Ser	3,7	3,1	3
Thr	3,7	3,1	3
Pro	13,4	11,0	11
Hypro	11,3	9,3	9
Asp	6,1	5,0	5
Glu	9,6	8,0	8
Lys	4,8	4,0	4
Arg	2,6	2,1	2
Summe	100,0	82,5	82
MG (Analyse): 7478			
MG (Sanger): -			
N-terminal: -			
C-terminal: -			

Fraktion N_{VIe3}

As.	Mol %	Ver- háln.	Abger. Werte
Gly	41,4	30,0	30
Ala	14,1	10,2	10
Val	1,5	1,1	1
Ser	5,3	3,8	4
Thr	2,6	1,9	2
Pro	6,6	4,8	5
Glu	3,2	2,3	2
Asp	12,3	8,9	9
Lys	3,0	2,2	2
Arg	10,0	7,2	7
Summe	100,0	71,4	72
MG (Analyse): 6221			
MG (Sanger): -			
N-terminal: -			
C-terminal: -			

Fraktion N_{VIg}

As.	Mol %	Ver- háln.	Abger. Werte
Gly	33,3	28,1	28
Ala	11,5	9,8	10
Val	2,5	2,1	2
Leu	2,2	2,0	2
Ileu	1,1	1,0	1
Phe	2,3	1,9	2
Ser	1,6	1,2	1
Thr	2,4	2,1	2
Met	1,1	0,9	1
Pro	14,6	12,2	12
Hypro	9,7	8,2	8
Asp	3,2	2,8	3
Glu	9,2	7,8	8
Lys	3,2	2,9	3
Arg	2,1	1,8	2
Summe	100,0	84,8	84
MG (Analyse): 7722			
MG (Sanger): 2300			
N-terminal: Gly			
C-terminal: 1,9 Lys, 0,9 Arg			

Fraktion N_{VIg1}

As.	Mol %	Ver- háln.	Abger. Werte
Gly	34,5	38,2	38
Ala	12,8	14,1	14
Val	1,8	1,9	2
Leu	2,5	2,8	3
Ser	3,0	3,2	3
Thr	1,1	1,1	1
Met	1,7	2,0	2
Pro	7,4	8,1	8
Hypro	12,0	13,1	13
Asp	2,6	2,9	3
Glu	14,4	16,0	16
Lys	1,8	2,0	2
Arg	4,4	4,9	5
Summe	100,0	110,3	110
MG (Analyse): 10035			
MG (Sanger): 3450			
N-terminal: Gly			
C-terminal: Arg			

Fraktion N_{VIg2}

As.	Mol %	Ver- háln. Werte	Abger. Werte
Gly	34,3	17,0	17
Ala	9,0	4,3	4
Val	4,3	2,1	2
Leu	3,8	2,0	2
Ser	7,6	3,8	4
Thr	3,8	2,0	2
Pro	10,6	5,2	5
Hypro	14,1	7,0	7
Glu	8,2	4,0	4
Arg	4,3	2,1	2
Summe	100,0	49,5	49
MG (Analyse): 4354			
MG (Sanger): -			
N-terminal: Gly			
C-terminal: Arg			

Fraktion N_{VIh1}

As.	Mol %	Ver- háln. Werte	Abger. Werte
Gly	35,4	21,2	21
Ala	13,5	8,1	8
Val	1,6	1,0	1
Leu	3,0	1,8	2
Ser	3,2	1,9	2
Met	1,3	0,8	1
Pro	8,5	5,1	5
Hypro	10,5	6,2	6
Asp	6,3	3,8	4
Glu	12,0	7,2	7
Lys	1,9	1,2	1
Arg	2,8	1,7	2
Summe	100,0	60,0	60
MG (Analyse): 5175			
MG (Sanger): -			
N-terminal: -			
C-terminal: -			

Fraktion N_{VIi1}

As.	Mol %	Ver- háln. Werte	Abger. Werte
Gly	35,4	20,0	20
Ala	19,9	9,3	9
Leu	4,6	2,8	3
Ser	3,3	2,0	2
Met	1,6	1,0	1
Pro	1,9	1,1	1
Hypro	16,6	9,8	10
Asp	5,0	3,0	3
Glu	12,4	7,3	7
Arg	3,3	2,0	2
Summe	100,0	58,3	58
MG (Analyse): 5233			
MG (Sanger): 1600			
N-terminal: Gly			
C-terminal: Arg			

Fraktion N_{VIi2}

As.	Mol %	Ver- háln. Werte	Abger. Werte
Gly	39,0	15,1	15
Ala	20,6	9,0	9
Val	2,3	1,0	1
Phe	2,5	1,0	1
Ser	2,4	1,0	1
Pro	8,8	3,9	4
Hypro	6,8	3,0	3
Asp	4,4	1,9	2
Glu	8,3	3,6	4
Hyls	3,3	1,2	1
Arg	1,6	0,8	1
Summe	100,0	41,5	42
MG (Analyse): 3622			
MG (Sanger): -			
N-terminal: Gly			
C-terminal: -			

Fraktion N_{Vik1}

As.	Mol %	Ver- háln. .	Abger. Werte
Gly	35,5	37,2	37
Ala	13,2	14,2	14
Val	1,9	2,1	2
Leu	3,7	3,9	4
Phe	1,8	2,0	2
Ser	3,5	3,8	4
Pro	8,2	8,8	9
Hypro	10,0	10,9	11
Asp	3,9	4,2	4
Glu	13,8	15,0	15
Lys	1,7	1,8	2
Arg	2,8	3,1	3
Summe	100,0	107,0	107
MG (Analyse): 9659			
MG (Sanger): -			
N-terminal: -			
C-terminal: -			

Fraktion N_{Vik2}

As.	Mol %	Ver- háln. .	Abger. Werte
Gly	33,8	14,9	15
Ala	15,2	6,8	7
Val	2,2	1,0	1
Leu	2,8	1,2	1
Phe	2,1	1,0	1
Ser	2,9	1,2	1
Pro	11,1	5,0	5
Hypro	8,9	4,0	4
Asp	3,8	1,7	2
Glu	11,1	4,9	5
Lys	1,6	0,8	1
Hyllys	2,0	1,0	1
Arg	2,5	1,0	1
Summe	100,0	44,5	45
MG (Analyse): 4043			
MG (Sanger): -			
N-terminal: -			
C-terminal: -			

Fraktion N_{VII1}

As.	Mol %	Ver- háln. .	Abger. Werte
Gly	33,1	33,2	33
Ala	11,7	9,9	10
Val	2,8	2,1	2
Leu	4,3	4,0	4
Phe	2,2	1,9	2
Ser	4,6	4,0	4
Pro	11,8	14,2	14
Hypro	10,8	11,9	12
Asp	3,2	3,2	3
Glu	10,8	11,1	11
Lys	2,1	1,8	2
Arg	2,6	2,0	2
Summe	100,0	99,3	99
MG (Analyse): 9013			
MG (Sanger): 3000			
N-terminal: Gly			
C-terminal: 0,8 Lys, 2,1 Arg			

Fraktion N_{VII2}

As.	Mol %	Ver- háln. .	Abger. Werte
Gly	36,0	32,2	32
Ala	5,6	5,0	5
Val	1,1	1,0	1
Leu	4,3	3,9	4
Ser	4,7	4,1	4
Met	1,9	1,7	2
Pro	12,3	10,9	11
Hypro	10,0	9,0	9
Asp	6,3	5,7	6
Glu	9,9	8,9	9
Lys	1,3	1,2	1
Arg	6,6	5,9	6
Summe	100,0	89,5	90
MG (Analyse): 8366			
MG (Sanger): -			
N-terminal: -			
C-terminal: -			

Fraktion N_{VIn3}

As.	Mol %	Ver- háln.	Abger. Werte
Gly	34,7	15,1	15
Ala	7,0	3,0	3
Val	5,5	2,3	2
Leu	1,7	0,8	1
Ser	2,3	1,0	1
Pro	9,9	4,2	4
Hyp ^{ro}	12,3	5,3	5
Asp	13,5	5,9	6
Glu	6,6	2,9	3
Arg	6,5	2,9	3
Summe	100,0	43,4	43
MG (Analyse): 4082			
MG (Sanger): -			
N-terminal: -			
C-terminal: -			

Fraktion N_{VIO}

As.	Mol %	Ver- háln.	Abger. Werte
Gly	31,2	25,0	25
Ala	7,5	6,0	6
Val	3,6	2,9	3
Leu	6,0	4,8	5
Ser	1,2	1,0	1
Thr	7,2	5,8	6
Pro	12,9	10,2	10
Hyp ^{ro}	14,1	11,2	11
Asp	1,4	1,1	1
Glu	5,2	4,2	4
Lys	3,6	2,9	3
Arg	6,1	4,9	5
Summe	100,0	80,0	80
MG (Analyse): 7430			
MG (Sanger): -			
N-terminal: Gly			
C-terminal: -			

Fraktion N_{VIs}

As.	Mol %	Ver- háln.	Abger. Werte
Gly	33,4	20,2	20
Ala	12,9	7,8	8
Val	2,4	1,1	1
Leu	1,8	1,1	1
Ileu	1,0	0,7	1
Phe	1,0	0,7	1
Ser	10,5	6,7	7
Thr	1,3	0,8	1
Met	1,2	0,7	1
Pro	5,3	3,2	3
Asp	3,5	2,8	3
Glu	6,4	3,9	4
Lys	2,7	1,8	2
His	7,2	4,3	4
Arg	6,5	4,0	4
G.A. ⁺	2,9	2,0	2
Summe	100,0	61,8	63
MG (Analyse): 5947			
MG (Sanger): -			
N-terminal: Gly			
C-terminal: (Glucosamin?)			

Fraktion N_{VIs1}

As.	Mol %	Ver- háln.	Abger. Werte
Gly	35,6	12,1	12
Ala	8,1	2,8	3
Ser	11,0	3,7	4
Pro	6,5	2,2	2
Hyp ^{ro}	12,6	4,2	4
Asp	9,2	3,1	3
Glu	11,4	3,9	4
Lys	5,6	1,9	2
Summe	100,0	33,9	34
MG (Analyse): 3026			
MG (Sanger): -			
N-terminal: -			
C-terminal: -			

⁺ G.A. = Glucosamin

Fraktion N_{Vit2}

As.	Mol %	Ver- háln..	Abger. Werte
Gly	35,2	29,0	29
Ala	24,0	19,7	20
Ileu	4,1	3,2	3
Ser	1,1	0,9	1
Pro	8,3	6,8	7
Hypro	9,4	7,8	8
Asp	10,0	8,2	8
Glu	2,4	2,0	2
Lys	0,8	0,7	1
Arg	4,7	3,8	4
Summe	100,0	82,1	83
MG (Analyse): 7088			
MG (Sanger): -			
N-terminal: -			
C-terminal: -			

Fraktion N_{VIV}

As.	Mol %	Ver- háln..	Abger. Werte
Gly	34,0	21,9	22
Ala	11,8	7,8	8
Val	3,3	2,1	2
Leu	1,0	0,8	1
Phe	2,6	1,8	2
Ser	6,7	4,2	4
Thr	3,3	2,1	2
Pro	7,8	5,0	5
Hypro	6,2	3,9	4
Asp	6,2	3,9	4
Glu	9,7	6,1	6
Lys	5,9	3,8	4
Arg	1,5	1,0	1
Summe	100,0	64,5	65
MG (Analyse): 5840			
MG (Sanger): 1700			
N-terminal: Gly			
C-terminal: 2,1 Lys, 1,0 Arg			

Fraktion N_{VIW}

As.	Mol %	Ver- háln..	Abger. Werte
Gly	24,0	15,0	15
Ala	9,9	6,2	6
Val	4,9	3,1	3
Leu	2,4	1,5	1-2
Phe	1,8	1,2	1
Ser	13,2	8,2	8
Thr	9,3	5,8	6
Tyr	1,6	1,0	1
Met	1,4	0,9	1
Pro	5,1	3,1	3
Hypro	6,1	3,8	4
Asp	4,9	3,1	3
Glu	1,4	0,9	1
Lys	6,3	3,9	4
Arg	4,9	3,0	3
G.A. ⁺	2,8	1,7	2
Summe	100,0	62,4	62-63
MG (Analyse): 5913			
MG (Sanger): -			
N-terminal: Gly			
C-terminal: Lys			

Fraktion B₁

As.	Mol %	Ver- háln..	Abger. Werte
Gly	34,5	1,0	1
His	31,0	0,9	1
Arg	34,5	1,0	1
Summe	100,0	2,9	3
MG (Analyse): 368			
MG (Sanger): 360			
N-terminal: Gly			
C-terminal: Arg			

⁺ G.A. = Glucosamin

Fraktion B_{3c2}

As.	Mol %	Ver- hältn.	Abger. Werte
Gly	36,8	9,2	9
Ala	16,5	4,1	4
Pro	19,7	4,9	5
Arg	27,0	6,8	7
Summe	100,0	25,0	25
MG (Analyse): 2392			
MG (Sanger): -			
N-terminal: -			
C-terminal: -			

Fraktion B_{3d2}

As.	Mol %	Ver- hältn.	Abger. Werte
Gly	14,1	1,0	1
Leu	28,2	2,0	2
Ileu	13,4	1,0	1
Arg	44,3	3,1	3
Summe	100,0	7,1	7
MG (Analyse): 882			
MG (Sanger): -			
N-terminal: -			
C-terminal: -			

Fraktion B_{3f3}

As.	Mol %	Ver- hältn.	Abger. Werte
Gly	33,0	7,0	7
Ileu	33,9	7,2	7
Lys	5,0	1,0	1
Hylys	28,1	6,0	6
Summe	100,0	21,2	21
MG (Analyse): 2200			
MG (Sanger): -			
N-terminal: -			
C-terminal: -			

Fraktion B_{4d1}

As.	Mol %	Ver- hältn.	Abger. Werte
Gly	38,0	4,9	5
Ala	16,6	2,1	2
Pro	14,1	1,8	2
Glu	16,7	2,1	2
Arg	14,6	1,9	2
Summe	100,0	12,8	13
MG (Analyse): 1209			
MG (Sanger): -			
N-terminal: -			
C-terminal: -			

Fraktion B_{5r}

As.	Mol %	Ver- hältn.	Abger. Werte
Gly	45,7	17,7	18
Ala	8,4	5,0	5
Val	1,6	1,0	1
Leu	1,1	0,9	1
Ser	4,9	3,0	3
Thr	1,7	1,0	1
Pro	14,0	8,6	9
Hypro	6,2	3,7	4
Asp	3,0	1,8	2
Glu	3,8	2,1	2
Lys	3,0	1,8	2
Arg	6,6	3,9	4
Summe	100,0	50,5	52
MG (Analyse): 4670 MG (Sanger): 1420 N-terminal: Gly C-terminal: 2,0 Lys, 1,1 Arg			

Fraktion B_{6b}

As.	Mol %	Ver- hältn.	Abger. Werte
Gly	36,7	20,8	21
Ala	7,6	4,3	4
Val	1,6	0,9	1
Ileu	3,7	2,1	2
Phe	1,5	0,8	1
Ser	7,4	4,2	4
Thr	3,4	1,9	2
Pro	13,6	7,7	8
Hypro	10,3	5,9	6
Asp	2,2	1,2	1
Glu	3,8	2,1	2
Lys	1,7	1,0	1
Arg	6,5	3,7	4
Summe	100,0	56,6	57
MG (Analyse): 5100 MG (Sanger): - N-terminal: - C-terminal: -			

Fraktion B_{6d}

As.	Mol %	Ver- hältn.	Abger. Werte
Gly	37,0	1,1	1
Glu	30,6	0,9	1
Arg	32,4	1,0	1
Summe	100,0	3,0	3
MG (Analyse): 360 MG (Sanger): - N-terminal: - C-terminal: -			

L e b e n s l a u f

Als Sohn des Oberstudiendirektors Ewald Schleyer und seiner Frau Irma, geb. Kleinmann, wurde ich am 5. April 1931 in Elbing geboren.

Nach dem Besuch von drei Klassen Volksschule in Frankfurt a. O. und Fürstenwalde (Spree) absolvierte ich von 1940 bis 1949 die Oberrealschulen in Fürstenwalde, Perleberg und Miesbach, wo ich 1949 meine Reifeprüfung ablegte. - Im gleichen Jahr begann ich das naturwissenschaftliche Studium an der Münchener Universität; 1950 wurde ich zum Chemiestudium zugelassen, das ich mit einigen Unterbrechungen (Werkstudent) bis zum Vorexamen teilweise am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie und teilweise am Institut für anorganische Chemie durchführte. 1954 bestand ich die Vorprüfung für Lebensmittelchemiker und die Diplomvorprüfung für Chemiker; 1956 legte ich das Diplomchemiker-Hauptexamen ab.

Unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. M. Schwab und Herrn Prof. Dr. W. Graßmann führte ich am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung von 1956 bis 1957 meine Diplomarbeit über "Messungen des Zeta-Potentials an Trägermaterialien für Zonenelektrophorese" durch. Von 1957 bis 1960 arbeitete ich am gleichen Institut unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Graßmann an meiner Dissertation über "Chemische und enzymatische Untersuchungen zur Struktur des Kollagens".

Seit 1958 bin ich wissenschaftlicher Hilfsassistent, seit 1959 wissenschaftlicher Assistent am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in München.

Im März 1959 heiratete ich Fräulein Christine Wimmer.

